



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY

A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM EXPRESE TRANSFERINOVÝCH RECEPTORŮ A VYUŽITÍ V NANOMEDICÍNĚ

STUDY OF EXPRESSION OF TRANSFERRIN RECEPTORS (TFR1) AND THEIR UTILIZATION IN
NANOMEDICINE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Krausová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

BRNO 2017



Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Kateřina Krausová

ID: 164211

Ročník: 3

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Studium exprese transferinových receptorů a využití v nanomedicině

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s možností exprese transmembránových TfR1 u nádorových onemocnění, a to především u nádorů prostaty, neuroblastomů a karcinomu prsu. 2) Příprava rešerše na téma TfR1 a nádorová onemocnění - možnosti aktivního transportu léčiv. 3) Studium exprese TfR1 u vybraných nádorových linií (karcinom prostaty, prsu a neuroblastom). 4) Příprava apoferitinové klece s enkapsulovaným doxorubicinem (ApoDox) a detailní charakterizace. 5) In vitro testování protinádorového efektu na vybraných nádorových liniích s různou mírou exprese TfR1. 6) Statistické zpracování získaných dat a jejich správná interpretace. 7) Provedte diskusi výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] HEGER, Zbynek, et al. Apoferritin applications in nanomedicine. Nanomedicine [online]. 2014, 9(14), 2233-2245.
- [2] HEGER, Zbynek, Natalia CERNEI, Jiri KUDR, et al. A Novel Insight into the Cardiotoxicity of Antineoplastic Drug Doxorubicin. International Journal of Molecular Sciences [online]. 2013, 14(11), 21629-21646.
- [3] BLAZKOVA, Iva, et al. Apoferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery. International Journal of Molecular Sciences [online]. 2013, 14(7), 13391-13402.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 2.6.2017

Vedoucí práce: Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem exprese transferinového receptoru (TfR1) a jeho využitím v nanomedicině. Během posledního desetiletí se nanotechnologie zařadily mezi centrální milníky při spojování všech vědeckých a technických disciplín. Nanoléčba již prokázala účinnost nejen u zvířecích modelů nádorových onemocnění, ale také v klinické praxi. V teoretické části je pojednáno nejen o nádorových onemocněních lidské populace, ale i o možnostech cílené dopravy nanoléčiva k nádorové tkáni, což značně snižuje jinak vážné vedlejší účinky konvenční léčby – systémovou toxicitu. V praktické části jsou optimalizovány podmínky pro studium exprese transferinového receptoru, což je protein, který ve zvýšené míře exprimují neoplastické buňky za cílem uspokojení svých vyšších metabolických potřeb. Jako optimální byly pro detekci exprese transferinového receptoru u různých buněčných linií zvoleny následující podmínky: lyzát z 50 000 buněk nanášený do jamky gelu v neredukujícím nedenaturačním pufru, 1,0 $\mu\text{g/ml}$ primární protilátky. Byla zjištěna různá míra exprese v závislosti na typu buněk, přičemž byly vybrány buněčné linie neuroblastomu, nádoru prostaty (riziko výskytu u každého 7. muže) a karcinomu prsu (riziko výskytu u každé 8. ženy ve vyspělých zemích). Na transferinový receptor lze navázat apoferritin, což je protein, který v těle běžně slouží pro skladování iontů železa. Uměle však lze jeho vnitřní dutinu využít pro přepravu jakékoli molekuly, v případě této bakalářské práce se jednalo o doxorubicin. Právě doxorubicin je používán pro léčbu nádorových onemocnění již více než 30 let, nicméně terapeutická dávka je limitována jeho vysokou toxicitou. Tu lze snížit enkapsulováním cytostatika do vhodného přenašeče pro cílenou dopravu pouze k nádorovým buňkám. V práci bylo potvrzeno, že využití apoferritinu jako nanotransportéru pro přenos chemoterapeutika je vhodné díky velikosti molekul 10–12 nm, která umožňuje využití efektu zvýšené permeability a retence; zároveň jim tato velikost umožňuje vyhnout se renální clearance. Vlastnosti enkapsulovaného doxorubicinu nejsou apoferritinem nijak ovlivněny a zachovává si tak svoji toxicitu pro buňky s vysokou mírou exprese TfR1 (30% inhibice růstu těchto buněk po 24 hod léčby).

KLÍČOVÁ SLOVA

Nádorová onemocnění, nanomedicína, apoferritin, doxorubicin

ABSTRACT

Bachelor thesis deals with the expression of the transferrin receptor (TfR1) and its use in nanomedicine. During the last decade, nanotechnology emerged as one of the central milestones in connecting all scientific and technological disciplines. Nanomedicine already demonstrated efficacy not only in animal models of cancer but also in clinical practice. The theoretical part is not only aimed at cancer of the human population, but also at the possibilities of targeted drug delivery into the tumor tissue, which greatly reduces the otherwise serious side effects of conventional treatment – systemic toxicity. The practical part is focused on optimization for studying the expression of the transferrin receptor, a protein overexpressed by neoplastic cells aiming to enrich the higher metabolic needs of tumor cells. The optimal conditions were as follows: lysate of 50 000 cells applied with nonreducing nondenaturing buffer and the concentration of the primary antibody of 1.0 $\mu\text{g/ml}$. Different levels of TfR1 expression were detected, depending on the type of tumor cells. The cell lines of neuroblastoma, prostate cancer (occurrence in every 7th man) and breast cancer (occurrence in every 8th woman) were selected for the next experiments. *Via* this transferrin receptor, apoferritin, which is a protein storing iron ions in many organisms, can be internalized into cells. Artificially, the internal cavity of apoferritin may be used for encapsulation and transport of any molecules. In the case of this bachelor thesis, the apoferritin was used for delivery of doxorubicin. Doxorubicin has been used for cancer treatment for more than 30 years; however, its administered dose is limited by its high toxicity. This can be reduced by its encapsulation in a suitable vector for targeted transport to the tumor cells only. Apoferritin could serve as such suitable vector. In this thesis, the suitable usage of apoferritin as a nanocarrier for chemotherapeutic delivery was confirmed. Its molecule size of 10-12 nm allows it to employ the effect of increased permeability and retention. At the same time, this size makes it possible to avoid renal clearance. The properties of encapsulated doxorubicin are not affected by apoferritin, thus preserving its toxicity for cells with a high level of TfR1 expression (30% growth inhibition of these cells after 24 h of treatment).

KEYWORDS

Cancer, nanomedicine, apoferritin, doxorubicin

KRAUSOVÁ, Kateřina *Studium exprese transferinových receptorů a využití v nanomedicíně*: bakalářská práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2017. 63 s. Vedoucí práce byl Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Studium exprese transferinových receptorů a využití v nanomedicině“ jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil(a) autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl(a) nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom(a) následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autora(-ky)



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CEITEC 2020 LQ1601 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



PODĚKOVÁNÍ

Upřímný dík si zaslouží vedoucí práce Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

Měla jsem to štěstí, že jsem získala podporu skvělé konzultantky Ing. Simony Dostálové. Během práce na několika verzích jsem ocenila její připomínky. Za obětavou pomoc – stejně jako za mnoho dalších věcí – jsem jí nesmírně vděčná.

Cenné rady mi poskytoval celý tým Laboratoře nádorové biologie a nanomedicíny. Jejich rady byly inspirativní.

V Brně dne 2. června 2017

.....
podpis autorky

OBSAH

Úvod	15
1 Nádorová onemocnění	16
2 Nanomedicína	20
2.1 Teranostika	24
2.2 Internalizace molekul do buněk	25
3 Ferritin	26
3.1 Struktura ferritinu u zvířat a bakterií	27
3.2 Ferritin a jeho dopravení ke tkáni a do cílových buněk	27
4 Materiály a metody	29
4.1 Chemikálie	29
4.2 Kultivace a lýza buněk	29
4.3 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)	29
4.4 Western blot	30
4.5 Zapouzdření doxorubicinu do apoferritinu	31
4.6 Určení velikosti a povrchového náboje nanotransportéru	31
4.7 TEM	32
4.8 Studium krátkodobého vlivu apodox na buňky s různou mírou exprese TfR1	32
4.9 Studium dlouhodobého vlivu apodox na buňky s různou mírou ex- prese TfR1	32
4.10 Deskriptivní statistika	33
5 Výsledky a diskuze	34
5.1 Optimalizace počtu buněk	34
5.2 Optimalizace nanášecího pufru	35
5.3 Optimalizace ředění primární protilátky	36
5.4 Studium exprese transferinového receptoru u různých buněčných linií	37
5.5 Charakterizace apoferritinu	39
5.6 Charakterizace doxorubicinu	41
5.7 Enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu	43
5.8 Krátkodobý vliv apodox na buňky s různou mírou exprese transferi- nového receptoru	47

5.9	Dlouhodobý vliv apodox na buňky s různou mírou exprese transferi- nového receptoru	54
6	Závěr	58
	Literatura	59
	Seznam symbolů, veličin a zkratk	63

SEZNAM OBRÁZKŮ

2.1	Schéma EPR efektu v nádorové a zdravé tkáni.	21
5.1	Optimalizace počtu lyzovaných buněk nanesených do jamky gelu pomocí exprese GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) o velikosti přibližně 37 kDa. A) 100 000 buněk; B) 50 000 buněk; C) 25 000 buněk; D) 10 000 buněk. * určuje statisticky významný rozdíl detekce GAPDH v porovnání s detekcí u vzorku obsahujícího 50 000 buněk na jamku.	34
5.2	Optimalizace nanášecího pufru u vzorků nanesených do jamky gelu pomocí exprese TfR1 (transferinový receptor) o velikosti přibližně 84 kDa. N–neredukující, nedenaturační; R–redukující, nedenaturační; N95–neredukující, denaturační (inkubace při 95 °C 5 min); R95–redukující, denaturační (inkubace při 95 °C 5 min). GAPDH (přibližně 37 kDa) – housekeeping protein.* určuje statisticky významný rozdíl detekce TfR1 v porovnání s detekcí u vzorku inkubovaného v neredukujících nedenaturačních podmínkách.	36
5.3	Optimalizace ředění primární protilátky (proti TfR1) u vzorků nanesených do jamky gelu pomocí exprese TfR1 o velikosti přibližně 84 kDa. A) 0,7 µg/ml; B) 1,0 µg/ml; C) 2,0 µg/ml; D) 4,0 µg/ml. GAPDH (přibližně 37 kDa) – housekeeping protein. * určuje statisticky významný rozdíl detekce TfR1 v porovnání s detekcí u vzorku s koncentrací primární protilátky 1,0 µg/ml.	37
5.4	Relativní exprese TfR1 u různých buněčných linií. PNT1A – buňky zdravé prostaty; LNCaP – nádor prostaty; PC-3 – nádor prostaty androgen nezávislý; 22RV1 – nádor prostaty; MDA-MB-231– nádor prsu; A2780 – karcinom vaječníků; HACAT – buňky zdravé kůže; UKF-NB4 – neuroblastom. * určuje statisticky významný rozdíl relativní exprese TfR1 v porovnání s expresí u UKF-NB4 buněk.	38
5.5	Transmisní elektronová mikroskopie s negativním barvením apoferritinu.	39
5.6	Rozložení velikostí částic apoferritinu.	40
5.7	Spektrum absorbance apoferritinu.	40
5.8	Fluorescenční spektrum apoferritinu při excitaci světlem o vlnové délce 480 nm.	41
5.9	Spektrum absorbance pro volný doxorubicin o koncentraci 1000 µg/ml.	42
5.10	Spektrum fluorescence pro volný doxorubicin o koncentraci 1000 µg/ml při excitaci světlem o vlnové délce 480 nm.	42
5.11	Graf závislosti absorbance doxorubicinu na jeho koncentraci.	43

5.12	Graf závislosti fluorescence doxorubicinu na jeho koncentraci při excitaci světlem o vlnové délce 480 nm.	43
5.13	Graf spektrofotometricky detekovaného množství enkapsulovaného doxorubicinu v apoferritinovém nanotransportéru v závislosti na množství aplikovaného doxorubicinu k apoferritinu. * určuje statisticky významný rozdíl absorbance doxorubicinu o koncentraci 615,0 $\mu\text{g/ml}$ v porovnání s absorbancemi doxorubicinu o nižších koncentracích. . .	44
5.14	Absorpční spektra apodox o koncentraci 615,0 $\mu\text{g/ml}$ před filtrací od volného doxorubicinu a po ní.	45
5.15	Fluorescenční spektra apodox o koncentraci 615,0 $\mu\text{g/ml}$ před filtrací od volného doxorubicinu a po ní.	46
5.16	Transmisní elektronová mikroskopie s negativním barvením apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem – apodox.	47
5.17	Rozložení velikostí částic apodox.	47
5.18	Fluorescenční mikroskopie ukazující fluorescenci doxorubicinu a doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu (apodox) v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru v porovnání s autofluorescencí neléčených buněk (Kontrola).	48
5.19	Číselné vyjádření fluorescence doxorubicinu v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl fluorescence UKF-NB4 v porovnání s fluorescencí ostatních nádorových buněčných linií.	49
5.20	Číselné vyjádření fluorescence apodox v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl fluorescence UKF-NB4 v porovnání s fluorescencí ostatních nádorových buněčných linií.	49
5.21	Fluorescenční mikroskopie ukazující míru oxidačního stresu při léčbě doxorubicinem a apodox v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru v porovnání s oxidačním stresem neléčených buněk (Kontrola).	50

5.22	Číselné vyjádření oxidačního stresu způsobeného volným doxorubicinem v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl oxidačního stresu UKF-NB4 v porovnání s oxidačním stresem ostatních nádorových buněčných linií.	51
5.23	Číselné vyjádření oxidačního stresu způsobeného apodox v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl oxidačního stresu UKF-NB4 v porovnání s oxidačním stresem ostatních nádorových buněčných linií.	52
5.24	Pozorování změn morfologie buněk neuroblastomové linie UKF-NB4 v ambientním světle bez aplikované inhibiční látky (A), s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem (B) a s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem enkapsulovaným v apoferritinu (apodox, C). Na obrázku lze pozorovat typické morfologické znaky apoptózy, jakovje blebbing či tvorba apoptických tělísek.	52
5.25	Pozorování změn morfologie buněk z kostní metastázy nádoru prostaty PC-3 v ambientním světle bez aplikované inhibiční látky (A), s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem (B) a s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem enkapsulovaným v apoferritinu (apodox, C).	53
5.26	Pozorování změn morfologie buněk z plicní metastázy nádoru prsu MDA-MB-231 v ambientním světle bez aplikované inhibiční látky (A), s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem (B) a s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem enkapsulovaným v apoferritinu (apodox, C).	54
5.27	Rychlosti proliferace buněk v časových intervalech po šesti hodinách u buněčné linie UKF-NB4 neléčené a léčené doxorubicinem/apodox. * určuje statisticky významný pokles růstu léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk. ** určuje statisticky významný přírůstek léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk.	55
5.28	Rychlosti proliferace buněk v časových intervalech po šesti hodinách u buněčné linie PC-3 neléčené a léčené doxorubicinem/apodox. * určuje statisticky významný pokles růstu léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk. ** určuje statisticky významný přírůstek léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk.	56

- 5.29 Rychlosti proliferace buněk v časových intervalech po šesti hodinách u buněčné linie MDA-MB-231 neléčené a léčené doxorubicinem/apodox. * určuje statisticky významný pokles růstu léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk. ** určuje statisticky významný přírůstek léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk. . . 57

SEZNAM TABULEK

- 1.1 Výčet 10 nejčtetnějších typů nádorových onemocnění u žen [1]. . . . 17
- 1.2 Výčet 10 nejčtetnějších typů nádorových onemocnění u mužů [1]. . . . 17

ÚVOD

Na nádorová onemocnění umírá stále více lidí. Hlavní vinu nese nevhodný životní styl, prostředí, ve kterém žijeme, ale také genetické predispozice. Na nádorová onemocnění umírá každá pátá žena a každý čtvrtý muž ve vyspělých zemích. Tato čísla jsou sice alarmující, ale více než samotná úmrtnost by měla vyvolávat debatu otázka kvality života pacientů s diagnostikovanými nádorovými onemocněními. Ačkoli jsme schopni karcinomy léčit různými způsoby, každý z nich doprovází mnoho vedlejších účinků, které negativně ovlivňují nejen fyzickou, ale i psychickou stránku života pacientů.

Systémovou toxicitu lze omezit cílením léčby pouze na nádorové buňky. Toho lze docílit uzavřením chemoterapie do vhodného nosiče, který je možno zacílit na antigeny ve zvýšené míře exprimované nádorovými buňkami. Jedním typem z těchto antigenů jsou transferinové receptory. Na toto téma je v bakalářské práci provedena literární rešerše. Teoretická část práce je kromě samotných receptorů zaměřena také na vhodný nosič chemoterapie – apoferritin, který pro internalizaci do buněk využívá právě tyto transferinové receptory. Jelikož se jedná o částici o nano rozměrech, jedna z kapitol pojednává o nanomedicině, a to jak o perspektivě, tak i o překážkách, se kterými se tato léčba setkává.

V praktické části této práce byly optimalizovány podmínky pro studium exprese transferinového receptoru u různých nádorových buněčných linií. Získané výsledky byly ověřeny *in vitro* testováním protinádorového efektu apoferritinu. Do tohoto nanotransportéru bylo enkapsulováno jedno z nejčastěji používaných chemoterapeutických léčiv, doxorubicin, které se vyznačuje vysokou kardiotoxicitou.

1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Světová incidence nádorových onemocnění je neustále na vzestupu kvůli stabilnímu nárůstu populace a hlavně jejímu stárnutí. Vlivem špatného výběru životního stylu v rozvíjejícím se světě na následky nádorových onemocnění umírá 64 % lidí. V roce 2012 bylo odhadnuto, že více než 1,5 milionu pacientů bude nově diagnostikovaných nádorovými onemocněními každý rok [1].

V Tabulce 1.1 a Tabulce 1.2 jsou zobrazena odhadovaná čísla přeživších pro 10 nejčastěji diagnostikovaných druhů nádorových onemocnění v USA z 1. ledna 2014. 64 % nemocných bylo diagnostikováno před 5 a více lety. 15 % nemocných bylo diagnostikováno před 20 a více lety. Téměř polovina diagnostikovaných je starší 70 let a více. Pro ženy je největším rizikem karcinom prsu. Ačkoli je riziko výskytu nejvyšší ze všech zkoumaných druhů nádorového bujení, procento přeživších je nejvyšší ze všech typů maligních nádorů. Tento paradox vzniká především vysokým podílem prevence, kdy je mnoho případů podchyceno již v raném stadiu a léčba tak může být zahájena dostatečně brzy na to, aby byla účinná. Jinak je tomu u děložního čípku, kdy je sice riziko výskytu mnohonásobně menší, kdežto šance na přežití této diagnózy jsou pouze tři procenta. Z veškeré ženské populace mají nádorová onemocnění na svědomí každý pátý život.

U mužů je největším rizikem nádor prostaty. Za život může postihnout každého sedmého muže. Především díky včasné diagnostice a odborné péči přežije toto onemocnění 43 % nemocných. Karcinom plic a průdušek, stejně jako karcinom tlustého střeva zaujímá stejné postavení jak u žen, tak u mužů. Riziko výskytu je relativně vysoké, například u karcinomu tlustého střeva je v ohrožení každý jednadvacátý muž a třiadvacátá žena, zatímco šance na přežití je pouhých devět, respektive osm procent.

Nádorová onemocnění jsou charakterizována jako onemocnění spojené s volným růstem a šířením abnormálních buněk. Nádorová onemocnění jsou způsobena jak vnitřními, tak vnějšími faktory od nevhodného stravování, dědičnými mutacemi až po ionizující záření. Od počátečního rozvoje po okamžik, kdy je možné karcinom diagnostikovat, většinou uplyne dlouhá doba. V pokročilé fázi onemocnění je ale často již obtížná, ne-li zcela nemožná léčba [1].

Nádor je charakterizován jako neoplazma, nekoordinovaný shluk buněk, které agresivně proliferují a vykazují neřízený růst. Nádor se skládá ze dvou složek – proliferující buňky a stroma, které obsahuje cévy a pojivové tkáně. Aby mohl nádor metastazovat, enzymy jako matrixové metaloproteinasy musí zničit okolní tkáň cév. Jakmile kapilára prosakuje, případně je zcela zničena, mohou se shluky buněk nádoru pohybovat i do vzdálených částí celého těla. Maligní nádory často indikují angiogenezi, která zprostředkuje růst vlastního krevního zásobení pro uspokojení vyšší

	Riziko výskytu		Riziko úmrtí		Počet přeživších
	%	1 z	%	1 z	
Všechny typy rakoviny	37,58	3	19,13	5	7607230
Prsa	12,32	8	2,69	37	3 131 440 (41%)
Plíce a průdušky	6,04	17	4,89	20	233 510 (3%)
Tlusté střevo a konečník	4,35	23	1,81	55	624 340 (8%)
Děloha	2,78	36	0,58	172	624 890 (8%)
Non-Hodgkin lymfom	1,89	53	0,68	147	272 000 (4%)
Štítná žláza	1,72	58	0,07	1 429	470 020 (6%)
Melanom	1,63	61	0,21	476	528 860 (7%)
Vaječníky	1,31	76	0,97	103	199 900 (3%)
Ledviny	1,20	83	0,34	294	159 280 (2%)
Děložní čípek	0,64	156	0,23	435	244 180 (3%)

Tab. 1.1: Výčet 10 nejčastějších typů nádorových onemocnění u žen [1].

	Riziko výskytu		Riziko úmrtí		Počet přeživších
	%	1 z	%	1 z	
Všechny typy rakoviny	42,05	2	22,62	4	6 876 600
Prostata	13,97	7	2,58	39	2 975 970 (43%)
Plíce a průdušky	7,19	14	6,33	16	196 580 (3%)
Tlusté střevo a konečník	4,69	21	1,99	50	621 430 (9%)
Močový měchýř	3,84	26	0,92	109	455 520 (7%)
Melanom	2,62	38	0,43	233	516 570 (8%)
Non-Hodgkin lymfom	2,37	42	0,86	116	297 820 (4%)
Ledviny	2,03	49	0,62	161	229 790 (3%)
Leukemie	1,75	57	1,03	97	177 940 (3%)
Dutina ústní a hltan	1,55	65	0,40	250	194 140 (3%)
Varlata	0,38	263	0,02	5 000	244 110 (4%)

Tab. 1.2: Výčet 10 nejčastějších typů nádorových onemocnění u mužů [1].

potřeby zásobení živinami a kyslíkem pro další růst [2]. Rozvoj nádorových onemocnění zahrnuje sérii alerací, které často trvají dekády, než se zcela dané onemocnění projeví. Ve většině případů je konečným aktivátorem pozměněný gen, který reguluje diferenciaci a růst buňky. Molekulární markery jsou stále předmětem studií především z hlediska toho, jak jejich přítomnost nebo absence ovlivňuje rozvoj nádorových

onemocnění. Příkladem takového markeru je tumor supresor p53. Tento supresorový protein je jeden z nejdůležitějších v buněčném cyklu jak v normálních buňkách, tak v těch postižených nádorovým onemocněním. Za fyziologických podmínek je p53 zodpovědný za ukončení buněčného růstu, je-li buňka zničena nebo vystavena fyziologickému stresu. Toto vede k apoptóze – programované smrti buňky. Preneoplastické buňky vykazují vysokou tendenci protein p53 eliminovat, díky čemuž mohou redukovat apoptotickou smrt [3]. Další skupinou genů, které ovlivňují vývoj nádorových onemocnění, jsou onkogeny, které zodpovídají za stimulaci buněčného růstu [2].

Je důležité zmínit, že jediná genetická změna není dostačující pro rozvoj maligního nádoru. Teprve několikanásobné mutace vedou k několikanásobnému procesu zahrnutému v rozvoji nádorového onemocnění. Jak tyto nádorové buňky začínají klonovat další cytologické obdoby sebe samých, stávají se odlišnými od původních nádorových buněk. Výsledkem těchto genetických rozmanitostí je odlišná odpověď na léčbu a nepředvídatelnost buněk. Toto způsobuje rozdílnou citlivost léčby v rámci jednoho nádoru nejen mezi různými pacienty, ale dokonce i v rámci jednotlivých buněk u stejného pacienta [3]. Buněčná senzitivita má významnou roli v chemoterapii – primární léčebné technice zodpovědné za léčbu milionů nemocných po celém světě [2].

Chemoterapie, coby způsob léčby nádorového bujení, je často označována jako antineoplastická terapie používaná k vymýcení všech neoplastických buněk ať už farmakologicky, operativně či radioléčbou. Největším problémem zůstává, že nádorové buňky se vyskytují v různém stádiu buněčného cyklu, nejvíce z nich pak v cyklu se sníženou rychlostí růstu. Buňky trpí sníženou rychlostí růstu především nedostatkem místa a živin jako výsledek konkurence, s čímž se setkáváme i u velkých nádorů. Chemoterapie nejlépe působí, jestliže se buňka nachází v dělicí fázi, kde převládá většina buněk nebude prokazovat rezistenci vůči léčbě. Jedním z hlavních problémů s antineoplastickou terapií je ten, že není selektivně specifická pro neoplastické buňky, může tedy eliminovat i zdravé buňky, především ty často se dělicí, jako jsou buňky sliznice nebo vlasových folikulů. Buňky zodpovědné za spouštění mnoha rozhodujících imunitních reakcí jsou léčbou též ovlivněny. Ta tak negativně působí na celkový imunitní systém pacienta a zvyšuje riziko rozvinutí bakteriální či virózní infekce [2].

Chemoterapie může být rozdělena do skupin založených na různých faktorech včetně jejich chemického složení a funkce. Tato práce bude zaměřena na antracyklin doxorubicin, jedno z nejčastěji používaných chemoterapeutik [4].

Doxorubicin se využívá pro léčbu nádorových onemocnění už více než 30 let. Ačkoli jeho schopnost bojovat s rychle se dělicími buňkami a zpomalení rozvoje nemoci samotné je známa již několik desetiletí, jeho použití je limitováno jeho vysokou

toxicitou pro zdravé buňky [5].

Primárním mechanismem účinku doxorubicinu je omezení topoisomerasy I a II, což je enzym sloužící k oddělování dvouvláknového řetězce DNA. Jeho vnořením do DNA dochází k interferenci, což v konečném důsledku vede k programované smrti buňky [2].

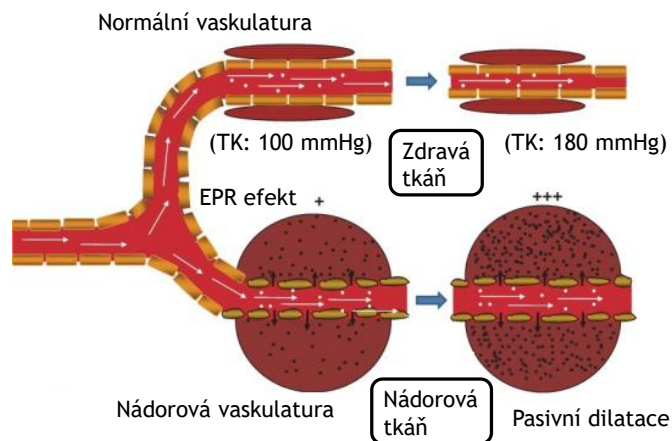
Jako většina léků i doxorubicin vstupuje do buněk pasivní difuzí. Hromadí se především v játrech, nejpravděpodobněji kvůli roli jater v metabolismu léčiv. Až 40 % pacientů podstupujících léčbu trpí některou z forem jaterního poškození. Jedním z dalších důvodů, proč musí být dávka doxorubicinu omezena, je i jeho kardiotoxicita. Pacienti jsou negativně ovlivněni různou měrou, od chronických až po akutní stavy. Doxorubicin je zodpovědný za strukturální změny kardiomyocytů v srdci, především jejich zvětšení [5].

2 NANOMEDICÍNA

Během posledního desetiletí se nanotechnologie zařadily mezi centrální milníky při spojování téměř všech vědeckých a technických disciplín. Mezi těmito disciplínami se bio-nanotechnologie také stávají jednou z hlavních subdisciplín, o čemž svědčí signifikantní nárůst vědeckých výstupů a roční rozpočty, které jsou na výzkum poskytovány. Obecně platí, že stabilní a dlouhá cirkulace v krevním řečišti je kritickým faktorem pro efektivní doručení a akumulaci nanočástice k cílenému dopravení léčiva [6].

Částice o nano velikosti mají řadu výhod oproti molekulám léčiv s nízkou molekulovou hmotností, včetně velkého povrchu, který poskytuje velkou vazebnou plochu, schopnosti chránit dopravovanou látku před degradací, umožňují specifické cílení na poškozené buňky a řízené nebo prodloužené uvolňování [7]. Tato funkce je umožněna tím, že lze modulovat vlastnosti nanočástic, jako je velikost, povrchové vlastnosti či další specifické modifikace [8]. Díky těmto výjimečným vlastnostem byla celá řada nanočástic připravena, testována a nakonec také uplatněna v klinické praxi [9]. Nanoléčba je zvláště důležitá při boji s nádorovými onemocněními, protože nádory mají často ve srovnání se zdravými cévami ve zdravé tkáni cévy s narušeným endotelem, což způsobuje jejich netěsnost. Jestliže jsou nanočástice podány intravenózně, mají tendenci cirkulovat v oběhu po delší dobu, a to především v případě, že nejsou příliš malé, aby se vylučovaly ledvinami, nebo jsou dostatečně velké, aby byly rychle rozpoznány a eliminovány retikuloendoteliálním systémem (RES) [10]. Z tohoto důvodu jsou nanočástice s dlouhou dobou oběhu přijímány přednostně do nádorové tkáně přes penetrovaný endotel nádorového cévního zásobení a jsou pak akumulovány uvnitř nádoru v důsledku snížené lymfatické drenáže (Obrázek 2.1). Tento proces je znám jako zvýšená propustnost a zadržování, neboli EPR efekt (z anglického Enhanced Permeability and Retention Effect). Nejvíce nanočástic se v nádorech hromadí pasivně právě díky EPR efektu. Účinky EPR efektu nicméně poskytují relativně nízkou specifickost, která nabízí pouze 20-30% zvýšení cílené dodávky ve srovnání s konvenčními typy léčby a tím snížení nutné dávky léčiva [11].

Nanomateriály prokázaly účinnost u zvířecích modelů nádorových onemocnění, několik dalších je testováno v různých fázích klinického testování, ale jsou i také, které jsou již používány v klinické praxi (Doxil, Abraxan, Eligard, Oncaspar, Daunoxom, Marqibo a další). Míry odezvy se však mění, což pravděpodobně souvisí s širokou heterogenitou EPR účinků pozorovaných u typů nádorů a v rámci jednotlivých nádorů. Souhrnný EPR efekt je závislý na mnoha faktorech, mezi kterými jsou specifické biologické funkce považovány za mající vliv na heterogenitu, včetně stupně angiogeneze a lymfangiogeneze. Tyto faktory dále ovlivňují stupeň perivaskulárního



Obr. 2.1: Schéma EPR efektu v nádorové a zdravé tkáni.

růstu nádorových cév a hustotou stromatu včetně tlaku uvnitř nádoru. Manipulací těchto podmínek může být účinek EPR vyšší, což vede k vynikajícím výsledkům podávání léků nano velikosti, čímž se zvyšují jejich protinádorové účinky [12].

V normálních tkáních vstupují částice s nízkou molekulovou hmotností do vyzrálých, hierarchicky uspořádaných vaskulárních sítí, začínajících v arteriích, pokračujících do arteriol a homogenně se distribuují uvnitř tkáně s ohledem na koncentrační gradient. Naopak v nádorové tkáni inhibuje několik faktorů homogenní distribuci nízkomolekulárních částic, zejména v rámci hluboko umístěných a centrálních částech nádoru. V porovnání s nízkomolekulárními částicemi mají nanočástice v tomto uspořádání několik výhod [13].

Aby mohl nádor růst, nádorové buňky tvoří neovaskulaturu s cílem zajistit dostatečný přísun živin a kyslíku. Jak nádory rostou, vytváří si nové cévy, nebo pohlcují ty již existující. Na rozdíl od mikrovaskulatury z normální tkáně, která má organizované a pravidelné větvené pořadí, tumorová mikrocirkulace ukazuje dezorganizaci a nedostatek konvenční hierarchie cévy. Arterioly, kapiláry a venuly nejsou identifikovatelné jako takové a místo toho jsou cévy rozšířené a často jsou propojeny obousměrnými zkraty. Jedním z fyziologických důsledků vaskulární abnormality je heterogenita průtoku krve nádorem, což zasahuje do homogenní distribuce léčiva v nádoru [14].

Kromě cévní heterogenity vykazují navíc cévy nádorů strukturní abnormality. Endoteliální povrch je prosvítající s mezerami mezi endoteliálními buňkami a je obklopen přerušovanou nebo zcela chybějící bazální membránou. Také obsahuje menší množství nebo špatně přilnavé pericyty [15]. Perivaskulární hladké svalstvo často chybí, což způsobuje, že nádor špatně reaguje na podněty. Vadná funkce endoteliální bariéry je jednou z nejlépe zdokumentovaných abnormalit nádorových cév. Netěsnosti v cévní stěně umožňují makromolekulám lepší přístup k nádorovým buňkám

z krevního oběhu, ale také přispívají k vysokému tlaku v intersticiálních částech nádorů, který může inhibovat akumulaci léčiva [16].

Heterogenita prokrvení v mikroprostředí nádoru vede k významnému gradientu v rychlosti proliferace buněk; nádorové buňky v blízkosti cév se rychle množí, zatímco nedostatek živin ovlivňuje nádorové buňky umístěny na hranici difuzního limitu nebo nad ním. To má za následek pokles proliferace v buňkách vzdálených od cév, zatímco buněčná hustota se zvýší v jejich blízkosti [17]. Léčba, která indukuje apoptózu nebo nekrózu má za následek lepší přenos částic všech molekulových velikostí, ale nejlepší výsledky jsou patrné zejména s nanočásticemi [18].

I přes bariérní defekt centrální nádorové cévy neprosakují tolik, jak se očekávalo, a to především z důvodu vysokého intersticiálního tlaku uvnitř nádorů, který vyrovnává konvenční hybnou sílu upřednostňující extravazaci. Vysoká vaskulární permeabilita, spojená s mechanickým stlačením navazujících cév proliferací nádorových buněk, způsobuje zvýšení intersticiálních tekutin v nádoru. Kromě toho nedostatek funkčních nádorových lymfatických cév uvnitř nádoru inhibuje vylučování této extracelulární tekutiny, což dále přispívá k intersticiální hypertenzi. Zvýšený intersticiální tlak kapaliny byl pozorován u různých druhů myší, stejně jako u lidských nádorů. Kromě inhibice konvenčně podávaných léků stlačuje zvýšený intersticiální tlak tekutiny krevní cévy tak, že krev je odkloněna od centra nádoru směrem k periferiím [19].

Dalším přístupem pro zlepšení dodávání nanoléciv do nádorové tkáně je fyziologické upravení vaskulatury nádorů. Několik antiangiogenních léků bylo schváleno a je již běžně používáno. Mezi nimi je například i antivaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) monoklonální protilátka, bevacizumab, který se používá pro blokování účinku VEGF tak, že inhibuje nádorovou angiogenezi a potlačuje růst nádoru snížením průtoku krve a vaskulární permeability. Na druhé straně, VEGF samotný může dočasně zvýšit prosakování a prokrvení v nádorové tkáni jako potenciální způsob, jak fyziologicky rozšířit EPR efekt [20].

Dodávka nanoléciva se údajně zefektivňuje po mnoha terapiích. Pravděpodobné vysvětlení je, že nádorové buňky samy o sobě působí jako bariéra pro hlubší penetraci nanoléciva. Například jednorázová aplikace rentgenové terapie, která poškodí nádorové buňky, ale nepoškodí cévní zásobení nádorové tkáně, zvyšuje dodávku nanočástic až dvojnásobně 8-12 hodin po záření. Tato dávka záření účinně zabije dobře okysličené nádorové buňky v blízkosti cév, tedy dočasně zvyšuje vaskulární permeabilitu, kdy byly morfologické změny vyvolané v perivaskulárních nádorových buňkách podstupujících apoptózu. Je zajímavé, že přebytek záření poškozuje cévy dostatečně a zabrání tak průtoku krve a negativně ovlivní dodávku nanoléciva [21].

Nanoléčba nádorových onemocnění je slibná především proto, že může obsahovat velkou koncentraci protinádorových léčiv a specificky cílit léčbu přímo k nádoru

na základě nemodifikovaného EPR efektu. Několik metod pro zlepšení dodávky nanoléčiva je zkoumáno. Tyto metody zlepšily dodávku až o téměř dvojnásobek ve srovnání s neléčenými nádory.

Nicméně vylepšené EPR účinky, které se vyskytují po fotoimunoterapii, indukují poškození ve vrstvách nádorových buněk bezprostředně sousedících s cévním systémem tumoru a mají dramatický vliv na perfúzi se specifickým cílením dodání nanočástic až 24násobně ve srovnání s neléčenými nádory. I přesto by selektivnější cílení vaskulatury na bázi modifikovaného EPR, který nezpůsobuje trombózu, mělo být klíčem k úspěšnému zlepšení nanoléčby [19].

Významným příkladem je Doxil, první generace nanofarmak na bázi liposomálního vektoru pro doxorubicin. Zatímco Doxil nebyl konjugován se zvláštní částí nebo zařízením pro cílení nebo řízené uvolňování, poskytuje lepší výsledky, zejména při léčbě nádorových onemocnění vaječníků a s AIDS souvisejícím Kaposiho sarkomem [6].

Teprve nedávno výzkumní pracovníci začali poukazovat na to, že nanočástice mohou také vyvolat proces autofagie podněcující destruktivní úmrtí buněk. Nanočástice tedy mohou být použity jako další typ potenciálních nanoléčiv pro léčení nádorových onemocnění. Autofagie, neboli buněčné sebetrávení, získala značnou pozornost v posledních deseti letech díky svému významu v lidském zdraví a nemocích, jako jsou například nádorová onemocnění, neurodegenerace nebo metabolický syndrom. Jedná se o vysoce regulovaný proces, který může degradovat poškozené buněčné organely, nefunkční proteiny a intracelulární patogeny, stejně jako recyklovat cytoplazmatický materiál pro udržování buněčné homeostázy. Proces autofagie zahrnuje několik kroků. Za prvé, dvojité membránové vesikuly, nebo autofagozóm jsou tvořeny přesmykem subcelulární membrány na oddělenou část cytoplazmy. Potom se autofagozóm spojí s lysosomem ke generování autolysosomů. Obsah je v rámci autolysosomů degradován působením hydrolytických enzymů. Nakonec jsou degradační produkty recyklovány zpět k udržení makromolekulární syntézy a produkci energie na buněčné úrovni. Normální bazální úroveň autofagie je nezbytná pro přežití, diferenciaci, vývoj a homeostázu v podstatě všech buněk. Abnormální autofagie se pak podílí na patologii řady lidských onemocnění. Aplikace různých nanomateriálů může vyvolat autofagickou odpověď v buněčných kultivačních systémech. Tyto nanomateriály patří mezi kvantové tečky, fulleren a jeho deriváty, oxidy lanthanoidů a jiné nanokrystaly oxidů, kovů vzácných zemin, stejně jako zlaté nanočástice [6].

Povrch nanočástic je možné modifikovat cílicími ligandy, jako jsou protilátky, nebo peptidy. Touto modifikací dochází ke zvýšenému vstupu nanočástic do cílových buněk, které ve zvýšené míře exprimují antigeny, na které tyto ligandy cílí. Typickým příkladem je RGD peptid (kyselina arginin-glycin-asparagová). Ten zvyšuje autofagii a konverzi nanokrystalů prostřednictvím interakce s integriny, kde integriny jsou

v nadměrné míře exprimovány v angiogenních endoteliálních buňkách.

Tyto nanočástice mohou být použity jako potenciální antiangiogenní léčba nádorových onemocnění, díky své schopnosti zvýšit protinádorové a EPR účinky. Ačkoli poškození endotelových buněk nádorových cév může odstranit překážky pro podání léčiva, zůstává riziko snížení nebo dokonce zastavení průtoku krve nádorem vzhledem k trombóze, a tím snížení vstupní funkce léků. Klíčem k úspěšnému zlepšení dodávky nanoléčiva na bázi modifikovaného EPR účinku je tedy účinnější selektivní cílení nádorových cév, které nezpůsobuje trombózu [19].

Vznik nanotechnologií nabídl velké příležitosti propojení diagnostiky s terapií a snížení negativních vedlejších účinků léčby. K paradigmatu snímkování před začátkem léčby nebo po ní je nyní přidána možnost snímkování i během samotného léčebného procesu. Je praktické, že mnoho nanomateriálů je samotnými zprostředkovateli snímkování. Jednou ze základních hnacích sil takovéto kombinace je to, že jak snímkování, tak terapie vyžadují dostatečnou akumulaci zprostředkovatelů v oblasti nemocné tkáně [22].

2.1 Teranostika

Pojem teranostika byl vytvořen pro definici současných snah v klinické praxi k rozvoji více specifických, individuálních terapií pro různá onemocnění, a pro kombinaci diagnostiky s terapií v jednotného zprostředkovatele. Příkladem jsou zlaté nanočástice poskytující mnoho unikátních vlastností, které byly zkoumány v nespočetných snímkových procesech jako například ve výpočetní tomografii [23].

Při všech snahách musí být brána zřetel na velikost povrchu částic, aby se předešlo vrozenému imunologickému rozpoznání a zabezpečila se tak dostatečně dlouhá cirkulace nanočástice pro možnost dosáhnutí jejího cíle. Nicméně i přes rychlý pokrok stále ještě není možné teranostické nanočástice použít v klinické praxi. Každá nanoplatforma má své vlastní výhody a možnosti uplatnění, přesto zatím převládají nevýhody. Mezi ně patří především toxicita, cena zlatých nanočástic, nízká senzitivita pro MRI kontrastní sondy a další [24].

Většina používaných kontrastních látek v současné době je složena z nízkomolekulárních komponent, které jsou nespecifické, proto se stává rozpoznání nemoci v rané fázi obtížným. Rozvoj kontrastních látek založených na nanočásticích nabízí široké spektrum pro inženýrskou specifitu a senzitivitu vyžadovanou při *in vivo* molekulárním snímkování. Mimoto nabízí velkou povrchovou plochu, lepší cirkulační čas a stabilitu, kontrolovanou toxicitu a cílení [2],[25]. Tradiční koncept rozdělení pojmů diagnóza a samotná léčba může v budoucnu vymizet. Nanotechnologie tyto hranice mažou [25].

2.2 Internalizace molekul do buněk

Pro návrh ideální nanočástice pro cílené dopravení léčiva je nezbytně nutné porozumět, jak buňky internalizují nanomateriály a jak parametry nanočástic ovlivňují tyto cesty buněčného vychytávání. Zdravá buňka internalizuje mnoho molekul o různých molekulových hmotnostech, nábojích a složení. Tento mechanismus se u různých buněk liší. Právě proto je důležité porozumět těmto základním biologickým procesům jak při buněčném vychytávání, tak při mechanismu s nanočásticemi [22].

Plasmatická membrána plní funkci fyzické bariéry pro biomolekuly a částice při vstupu do buňky, stejně jako při jejím opouštění. Pro usnadnění přenosu mezi vnějším prostředím a buněčnou signalizací si buňky rozvinuly několik specifických mechanismů, které by mohly být využity při internalizaci nanočástic. Tyto mechanismy jsou obecně známy pod pojmem endocytóza [25].

Neoplastické buňky často ve zvýšené míře exprimují na povrch cytoplazmatické membrány specifické antigeny, sloužící pro uspokojení vyšších metabolických potřeb těchto buněk. Typickými příklady těchto antigenů jsou transferinové nebo folátové receptory. Tohoto jde využít zacílením povrchu nanotransportérů na tyto receptory, díky čemuž budou takto specificky cílené nanotransportéry vstupovat právě do nádorových buněk [26].

3 FERRITIN

Ferritin je protein, který je široce distribuován u zvířat, rostlin a bakterií s výjimkou kvasinek. Jedná se o specifickou třídu bílkovin sloužících ke skladování železa a jeho detoxifikaci, kdy jedna molekula ferritinu může hromadit až 4 500 atomů železa uvnitř svojí vnitřní dutiny [27]. Ferritin byl objeven v roce 1937 francouzským vědcem Victorem Laufbergem, který izoloval nový protein z koňské sleziny, obsahující více než 20 % suché hmotnosti železa. Ferritin se obvykle skládá z 24 podjednotek, jež jsou uspořádány do 4-3-2 symetrie. Tvar podjednotky je válcový s délkou 5 nm a šířkou 2,5 nm. Pokud ferritin neobsahuje ve svojí struktuře železo, sebesestavuje se do duté dvacetistěnné proteinové klece o vnějším průměru 12 nm a vnitřním průměru 8 nm (nazývanou apoferritin) [28].

I když je struktura ferritinu závislá na orgánu, odkud pochází, existují dvě konstrukční vlastnosti, které mají všechny doposud známé typy společné. Za prvé, ferritin je bohatý na kyselé zbytky, jako jsou zbytky kyseliny glutamové a kyseliny asparagové, které jsou distribuovány zejména na jeho vnitřním povrchu, což vede k relativně nízké hodnotě isoelektrického bodu ferritinu v rozmezí 5,0-6,0. V důsledku toho má ferritin vysokou hustotu záporného náboje na vnitřním povrchu, přičemž náboj na jeho vnějším povrchu se blíží nule nebo nabývá mírně kladných hodnot při pH 7,0. Ve svojí struktuře každý ferritin obsahuje osm trojhranných a šest čtyřhranných kanálů s velikostí pórů mezi 0,3-0,5 nm, které spojují vnitřní dutinu s roztokem [27].

Prostřednictvím těchto kanálů mohou kovové ionty a malé organické molekuly s kladným nábojem difundovat do dutiny v důsledku elektrostatické přitažlivosti, zatímco velké molekuly nemohou vstoupit do dutiny vůbec v důsledku sterické zábrany [29].

Obecně platí, že všechny typy uspořádání ferritinu mají tři chemicky zřetelná rozhraní: vnitřní povrch, vnější povrch a rozhraní mezi podjednotkami [30]. S těmito třemi rozhraními lze manipulovat za účelem splnění požadované funkce.

Díky svým vlastnostem je apoferritin vhodný pro použití jako nanotransportér léčiv do nádorových buněk. Jeho výhodou je to, že jím vytvořené nanočástice jsou homogenní a mají uniformní velikost (přibližně 12 nm) [31]. Jeho hlavní výhodou je schopnost reverzibilní disociace a asociace v závislosti na okolním pH, díky čemuž mohou být malé molekuly léčiva snadno a efektivně enkapsulovány do vnitřní dutiny ferritinu bez použití jakýchkoliv organických rozpouštědel. Třetí výhodou je jeho přirozený výskyt v organismu, a to jak uvnitř buňky, i když na nízké úrovni (okolo 20 $\mu\text{g/l}$), tak v krevním řečišti, kde je stabilní a rozpustný [27]. Do buněk vstupuje pomocí receptorů pro transferin SCARA5 a TfR1. Apoferritinová klec je navíc pozoruhodně teplotně stabilní, může vydržet zahřátí až na 80 °C po dobu 10 min [28].

3.1 Struktura ferritinu u zvířat a bakterií

U obratlovců se ferritin většinou skládá ze dvou typů podjednotek, H (těžký) a L (lehký), s molekulovou hmotností 21 a 19,5 kDa. Ferritin u nižších obratlovců, jako jsou například ryby, obsahuje třetí typ podjednotky. Jedná se o H' řetězec, který obsahuje jak zbytky tvořící ferroxidasové centrum, tak nukleární prvky [27]. Mezi nejznámější savčí ferritiny lze zařadit cytosolické heteropolymerní proteiny. Nový typ ferritinu byl nedávno identifikován u člověka, myši a krysy, jako homopolymer o 24 identických podjednotkách, které se nachází uvnitř mitochondrií. Lidský mitochondriální ferritin (MTF) je kódován pomocí genu na chromozomu 5q23.1. Ten má vysoký stupeň sekvenční homologie (79 %) s lidským H řetězcem ferritinu [32]. Na rozdíl od savců a rostlin má bakteriální ferritin tendenci být homopolymerem s podjednotkami, které jsou více podobné H řetězcům než L řetězcům [27].

3.2 Ferritin a jeho dopravení ke tkáni a do cílových buněk

Jak již bylo zmíněno v kapitole o nádorových onemocněních, klinická aplikace protinádorových léčiv je značně omezena jejich toxicitou a vysokou odolností nádoru. Právě pro snížení toxicity se výzkumné skupiny zabývají novou strategií dodání léčiv zapouzdřených v apoferritinu z koňské sleziny. Apoferritin je protein složený z 24 polypeptidových podjednotek, konstrukčně uspořádaných tak, aby vytvořily vnitřní dutinu o velikosti 8 nm v průměru. Tato dutina se přirozeně používá pro skladování iontů železa; nicméně uměle může být použita pro přenos jakékoliv molekuly. Díky své velikosti může apoferritin využít právě zvýšené permeability a retence pro internalizaci do nádorové tkáně [33].

Pro průnik z nádorové tkáně dále do buňky lze využít transferinový receptor TfR1, který je ve zvýšené míře neoplastickými buňkami exprimován na povrch cytoplazmatické membrány a je specifický pro transferin a H ferritin. Ferritin vstupuje do endosomu nebo lysosomu endocytózou. Na základě toho, že TfR1 má vysokou expresi v lidských nádorových buňkách, lze ho využít jako přenašeč právě ferritinu dovnitř buněk [27].

Struktura apoferritinu je za fyziologických podmínek uzavřena, zatímco snížením pH do vysoce kyselé oblasti (pH 2) je protein rozložen na podjednotky. Směs apoferritinových podjednotek a molekuly doxorubicinu vytváří základní roztok pro proces zapouzdření. Zvýšením hodnoty pH tohoto roztoku je struktura apoferritinu spojena, přičemž molekuly doxorubicinu jsou zapouzdřeny uvnitř dutiny [34].

Apoferritin je tak ideálním přenašečem protinádorového léčiva i vzhledem ke své

bezpečnosti, vysoké symetrii, rozpustnosti a stabilitě, uniformitě a snadnosti genetické a chemické manipulace [27].

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Chemikálie

Všechny chemikálie použité v práci byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), pokud není uvedeno jinak. pH roztoků bylo měřeno za použití pH metru WTW inoLab (Weilheim, Německo).

Složení jednotlivých roztoků bylo následující. PLB: 20% glycerol, 0,1% bromfenolová modř, 50mM Tris-HCl a 2% dodecylsulfát sodný. PLB-R: 87% PLB a 13% merkaptoetanol. Coomassie roztok A: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250 (CBR-250); 25% isopropanol a 10% kyselina octová. Coomassie roztok B: 0,005% CBR-250; 10% isopropanol a 10% kyselina octová. Coomassie roztok C: 0,002% CBR-250 a 10% kyselina octová. Coomassie roztok D: 10% kyselina octová. 2× blotovací pufr: 25mM Trizma báze, 150mM glycin, 10% (v/v) metanol (ředění: 10% metanol, 50% 2× blotovací pufr). Pufrovaný fyziologický roztok (PBS): 137mM KCl, 1,4mM KH_2PO_4 a 4,3mM Na_2HPO_4 , pH 7,4. Blokovací pufr: 1% sušené mléko v PBS. PBS-T: 500 μl Tween-20 v 1 l PBS.

4.2 Kultivace a lýza buněk

V práci byly použity následující buněčné kultury: MDA-MB-231 (lidské buňky z plicní metastázy nádoru prsu), LNCaP (lidské buňky z lymfatické metastázy nádoru prostaty), PC-3 (lidské buňky z kostní metastázy nádoru prostaty), PNT1A (lidské buňky z normální prostaty), 22RV1 (lidské buňky nádoru prostaty), A2780 (lidské buňky karcinomu vaječníků), HACAT (lidské buňky zdravé kůže), UKF-NB4 (lidské buňky neuroblastomu).

Buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře obsahující 5% CO_2 a 90% vlhkost. Buňky o 90% konfluenci byly sklizeny za použití směsi Trypsin-EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). 1 000 000 buněk byl lyzován 2 hod při 25 °C ve 200 μl lyzačního a extrakčního pufru RIPA, obsahujícího 1 μl inhibitoru proteáz. Lyzát byl dlouhodobě uchováván při -80 °C.

4.3 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

Pro separaci proteinů z buněčných lyzátů byl použit diskontinuální 12,5% separační SDS-PAGE gel s 6% koncentračním SDS PAGE gelem. Jako marker molekulové

hmotnosti byl použit Precision PlusTM Dual Xtra Prestained Protein Standard (BioRad, Hercules, CA, USA). 10 μ l vzorku bylo smícháno s 5 μ l neredukujícího nanášecího pufru PLB nebo redukujícího nanášecího pufru PLB-R. V rámci optimalizace byla testována i teplotní denaturace (95 °C 5 min, 600 rpm). Vzorky byly naneseny do jednotlivých jamek gelu. Žebříčku bylo naneseno 5 μ l. Elektroforéza probíhala 35 min při 200 V.

Gel byl obarven rychlým barvením coomassie modří. U rychlého barvení coomassie modří je nejdříve gel v roztoku a zahříván do varu na vysoký výkon v mikrovlnné troubě. Poté je v tomto roztoku třepán 5 min při 20 °C a 600 rpm. Gel je propláchnut demineralizovanou vodou a zahříván v roztoku B. Následuje propláchnutí a zahřívání v roztoku C. Po něm se již gel neoplachuje, ale je umístěn do odbarvovacího roztoku D, zahříván a posléze třepán 5 min při 20 °C a 600 rpm. Toto odbarvení je možné opakovat podle potřeby.

4.4 Western blot

Pro přenos proteinů z gelu na membránu byl využit blotovací sendvič. Membrána byla ponořena na 30 s do metanolu, poté na 5 min do čerstvě připraveného blotovacího pufru. Filtrační papíry a gely byly též ponořeny do blotovacího roztoku. Blotování trvalo 50 min při proudu 0,9 mA na 1 cm² membrány. Membrána byla 30 min blokována v blokovacím pufru na rotátoru. Poté byla membrána omyta pomocí PBS-T od zbytků mléka a inkubována s primárními protilátkami při 4 °C přes noc na rotátoru, což zajistilo neustálé omývání membrány. Jako primární protilátka byly použity myší protilátky proti GAPDH (1:700) a TfR1 v různých koncentracích (4,0 μ g/ml, 2,0 μ g/ml, 1,0 μ g/ml, 0,7 μ g/ml), ředěných pomocí protilátkového pufru (1 mg/ml hovězího sérového albuminu, BSA, v PBS). Membrána byla omyta pomocí PBS-T od zbytků primární protilátky a inkubována se sekundární protilátkou ředěnou protilátkovým pufrem. Inkubace trvala 1,5 hodiny při 20 °C. Vyhodnocení bylo uskutečněno fluorescenčně nebo kolorimetricky. Pro kolorimetrickou detekci byla použita králičí anti-myší protilátka se značením křenovou polymerázou (Dako North America, Santa Clara, CA, USA ředění 1:5000). Pro fluorescenční detekci byla použita kozí anti-myší protilátka se značením CFL 647 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, ředění 1:500).

4.5 Zapouzdření doxorubicinu do apoferritinu

20 μl apoferritinu z koňské sleziny o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bylo smícháno s 200 μl doxorubicinu o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 100 μl ACS vody. Po přidání 2,5 μl 1M kyseliny chlorovodíkové došlo k disociaci struktury apoferritinu vlivem pH 2,7 (WTW inoLab, Weilheim, Německo) a jeho části byly protřepáním smíchány s molekulami doxorubicinu. Inkubace probíhala 15 min. Pro enkapsulaci bylo následně přidáno 2,5 μl 1M hydroxidu sodného, který vytvořil neutrální pH (7,6). Díky tomu byly opět sestaveny podjednotky apoferritinu a do jeho dutiny byl uzavřen doxorubicin (tento komplex se označoval jako apodox). Pro odstranění neenkapsulovaného doxorubicinu byla použita sedimentace apodox při centrifugaci po dobu 15 min při 6000 ref a 4 $^{\circ}\text{C}$. Sedimentovaný apodox byl 3 \times promyt vodou. Objem byl poté doplněn na původní (325 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Výtěžnost enkapsulace a množství enkapsulovaného doxorubicinu byly určeny na základě optických vlastností doxorubicinu na přístroji Infinite M200 Pro (Tecan, Männendorf, Švýcarsko). Absorpční spektrum doxorubicinu a apodox bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 200-800 nm. Emisní spektrum doxorubicinu a apodox bylo měřeno s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisními vlnovými délkami 515-815 nm.

4.6 Určení velikosti a povrchového náboje nanotransportéru

Průměrná velikost nanotransportéru byla určena pomocí kvazielastického dynamického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Velký Británie). 50 μl nanotransportéru bylo naneseno do jednorázové polystyrenové kyvety Zen0040 (Brand GmbH, Wertheim, Německo). Parametry měření byly následující: úhel detektoru 173 $^{\circ}$, vlnová délka 633 nm, teplota 25 $^{\circ}\text{C}$, ekvilibrační čas 120 s, počet měření každého vzorku 6, index lomu vzorku 1,450; index lomu rozpouštědla 1,333.

Povrchový zeta potenciál nanotransportéru byl také určen pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Nanotransportér byl vždy destilovanou vodou naředěn 20 \times a 850 μl bylo přeneseno do jednorázové kyvety DTS1070 (Brand GmbH, Wertheim, Německo). Parametry měření byly následující: počet opakování jednoho měření mezi 20 a 40, Smoluchowskiho model úbytku koncentrace částic, $F(\text{ka})$ 1,5, ekvilibrační čas 120 s, počet měření každého vzorku 3, index lomu vzorku 1,450; index lomu rozpouštědla 1,333.

4.7 TEM

Vizualizace morfologie nanotransportérů byla provedena pomocí transmisní elektronové mikroskopie s negativním barvením organowolframovou sloučeninou Nano-W (Nanoprobes, Yaphank, NY, USA). 4 μ l vzorku byly nanесeny na měděnou mřížku pokrytou uhlíkovou vrstvou. Po zaschnutí vzorku byl vzorek vizualizován pomocí přístroje Tecnai F20 (FEI, Hillsboro, OR, USA) při 80 000 \times zvětšení.

4.8 Studium krátkodobého vlivu apodox na buňky s různou mírou exprese TfR1

Internalizace doxorubicinu/apodox do buněk a jejich krátkodobý vliv na ně byly sledovány pomocí ambientní a fluorescenční mikroskopie na přístroji IX 71S8F-3 (Olympus, Tokyo, Japonsko). 1 \times 10⁵ UKF-NB4 (vysoká TfR1 exprese), PC-3 (střední TfR1 exprese) a MDA-MB-231 (nízká TfR1 exprese) buněk v 1 ml IMDM (pro UKF-NB4) nebo RPMI 1640 (pro PC-3 a MDA-MB-231) média bylo použito v každé ze 12 jamek ve 12jамkové kultivační destičce a kultivováno po dobu 21 hodin. Po skončení inkubace bylo médium nahrazeno 200 μ l čerstvého media obsahujícího 34 μ M doxorubicinu/apodox. Buňky s doxorubicinem/apodox byly inkubovány další 2 hodiny.

Živé buňky byly promyty 200 μ l PBS a obarveny pomocí barvy CellRox Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v ředění 1:500 pro detekci oxidačního stresu. Buňky byly inkubovány po dobu 30 min. Poté byly buňky promyty 200 μ l PBS. Morfologie buněk byla sledována pomocí ambientního světla, pro vizualizaci oxidačního stresu byl použit filtr pro fluorescein isothiokyanát (excitace 460–495 nm, emise 510–550 nm, dichroické zrcadlo 505 nm), a fluorescence doxorubicinu byla sledována s použitím filtru Texas Red (excitace 545–580 nm, emise 610 nm, dichroické zrcadlo 600 nm) při 200 \times zvětšení. Všechny fotografie byly nahrány a upraveny pomocí softwaru Stream Basic.

4.9 Studium dlouhodobého vlivu apodox na buňky s různou mírou exprese TfR1

Pro sledování dlouhodobého vlivu doxorubicinu a apodox na nádorové buněčné linie s různou mírou exprese TfR1 byl použit přístroj XCELLigence RTCA DP (Roche Diagnostics GmbH, Basilej, Švýcarsko). Impedance pozadí byla měřena pomocí 100 μ l

kultivačního média IMDM (pro UKF-NB4) nebo RPMI 1640 (pro PC-3 a MDA-MB-231) s cytostatiky. Poté bylo do každé jamky 16jamkové kultivační destičky E-plate (Roche Diagnostic GmbH) nanášeno $1,5 \times 10^4$ buněk ve $100 \mu\text{l}$ kultivačního média. Inkubace probíhala při 37°C v atmosféře obsahující 5% CO_2 . Proliferace buněk byla sledována každých 30 s po dobu 10 min, poté každých 30 min po dobu 24 h. Experimenty byly provedeny ve 3 nezávislých opakováních.

4.10 Deskriptivní statistika

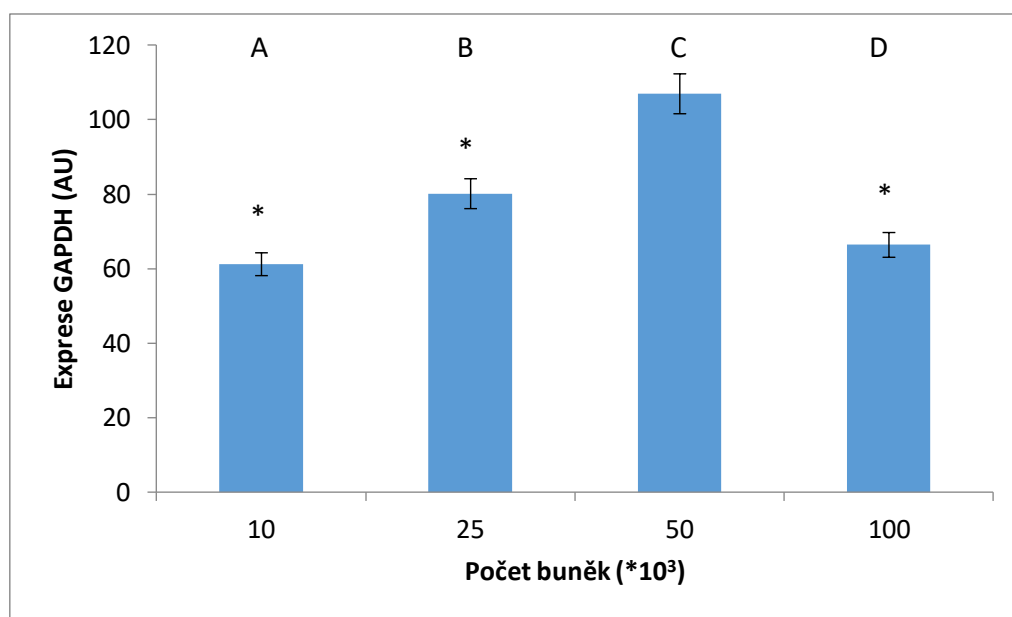
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka, pokud není uvedeno jinak. Rozdíly mezi skupinami byly analyzovány pomocí Studentova t-testu. Pokud není uvedeno jinak, byla použita hladina významnosti $\alpha=0,05$.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části bakalářské práce budou uvedeny výsledky experimentů vedoucích k optimalizaci studia exprese transferinového receptoru. Pro dosažení ideálních výsledků byl optimalizován počet buněk, koncentrace primární protilátky a složení nanášečícího pufru. Detekce exprese transferinového receptoru byla u všech experimentů provedena metodou Western blot. U každého optimalizačního kroku byl vždy zvolen ideální výsledek a ten následně používán pro všechny další experimenty.

Ze studia exprese transferinového receptoru u různých buněčných linií byly vybrány tři buněčné linie na základě různé míry exprese TfR1. Po podrobné charakterizaci apoferritinu a volného doxorubicinu byly sledovány jejich vlastnosti po spojení těchto molekul do jednoho celku (apodox) – enkapsulací doxorubicinu do vnitřní dutiny apoferritinu. V závislosti na zjištěné expresi TfR1 u jednotlivých buněčných linií byla sledována internalizace apodox do těchto buněk a jeho krátkodobý a dlouhodobý vliv.

5.1 Optimalizace počtu buněk



Obr. 5.1: Optimalizace počtu lyzovaných buněk nanesených do jamky gelu pomocí exprese GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) o velikosti přibližně 37 kDa. A) 100 000 buněk; B) 50 000 buněk; C) 25 000 buněk; D) 10 000 buněk. * určuje statisticky významný rozdíl detekce GAPDH v porovnání s detekcí u vzorku obsahujícího 50 000 buněk na jamku.

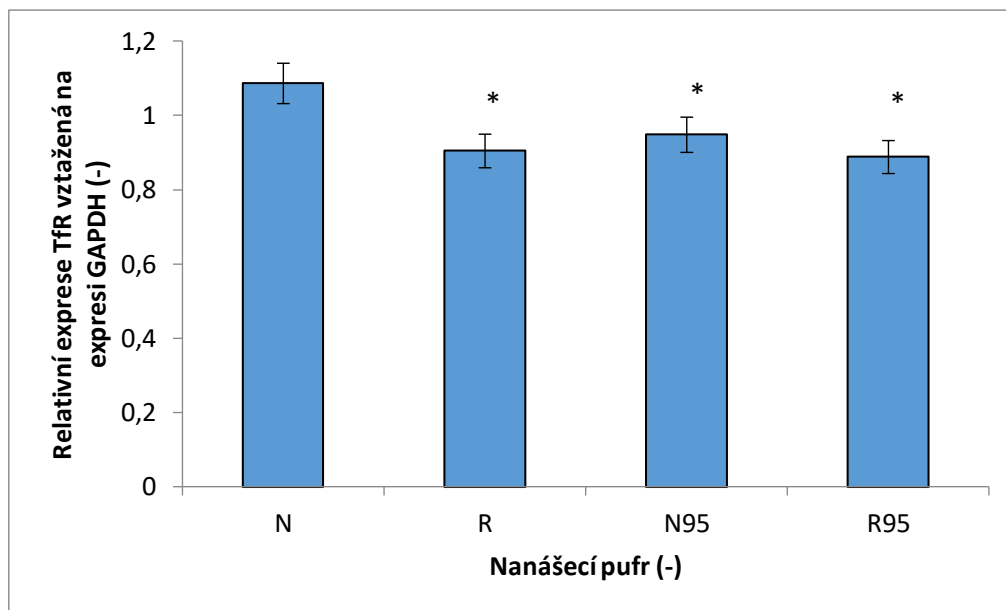
Pro studium exprese transferinového receptoru bylo nejdříve nutné optimalizovat počet buněk nanášených do jamky gelu. Lyzát byl připraven inkubací 1 000 000 buněk v RIPA lyzačním pufru. Pro optimalizaci byla použita detekce známého housekeeping proteinu GAPDH, enzymu zapojeného do metabolismu glukózy, jehož exprese je závislá pouze na počtu buněk, nikoliv na jejich vystavení působení různým vnějším podmínkám. Tento protein má velikost 37 kDa [35].

Obrázek 5.1 ukazuje výsledky detekce GAPDH v závislosti na počtu buněk. Pro optimalizaci bylo použito 100 000 (Obrázek 5.1A), 50 000 (Obrázek 5.1B), 25 000 (Obrázek 5.1C) a 10 000 (Obrázek 5.1D) buněk. Z výsledků je patrné, že se zvyšujícím se počtem buněk v jamce dochází k signifikantně citlivější detekci GAPDH ve vzorku (61,3 AU pro 10 000 buněk, 80,2 AU pro 25 000 buněk, 107,0 AU pro 50 000 buněk v jamce gelu). Příliš vysoké množství buněk 5.1 ale detekci naopak signifikantně snižuje (66,4 AU). Jako optimální množství bylo pro všechny následné experimenty použito 50 000 buněk v jamce gelu.

5.2 Optimalizace nanášecího pufru

Dalším krokem optimalizace bylo stanovení ideálního složení nanášecího pufru. Jako neredukující pufr byl použit PLB-max, redukující PLB-R, obsahující jako redukční činidlo merkaptoetanol. Denaturované vzorky byly povařeny po dobu 5 min při teplotě 95 °C. Pro optimalizaci byla použita detekce transferinového receptoru, jehož antigeny transferin a apoferritin jsou důležité pro uspokojení vyšších metabolických potřeb nádorových buněk, a proto je u nich tento receptor exprimován ve vyšší míře [26]. Naměřená exprese tohoto receptoru byla porovnána s expresí známého housekeeping proteinu GAPDH.

Obrázek 5.2 ukazuje výsledky detekce TfR1 v závislosti na složení nanášecího pufru. Pro optimalizaci byly použity neredukující, nedenaturační (Obrázek 5.2N); redukující, nedenaturační (Obrázek 5.2R); neredukující, denaturační (95 °C 5 min, Obrázek 5.2N95) a redukující, denaturační (95 °C 5 min, Obrázek 5.2R95) podmínky. Z experimentu je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití neredukujících nedenaturačních podmínek (Obrázek 5.2N, relativní exprese TfR1 1,1). Při denaturaci (Obrázek 5.2N95) poskytuje detekce nižší výsledky (relativní exprese TfR1 0,9) než při použití nedenaturačních podmínek. Při použití redukujícího nanášecího pufru bylo dosaženo ještě nižší citlivosti detekce TfR1, s relativní expresí TfR1 při použití nedenaturačních podmínek 0,9 (Obrázek 5.2R) a při použití denaturačních podmínek 0,9 (Obrázek 5.2R95). Jako optimální proto byly pro všechny následné experimenty použity neredukující nedenaturační podmínky, které se také nejvíce blíží fyziologickému prostředí.

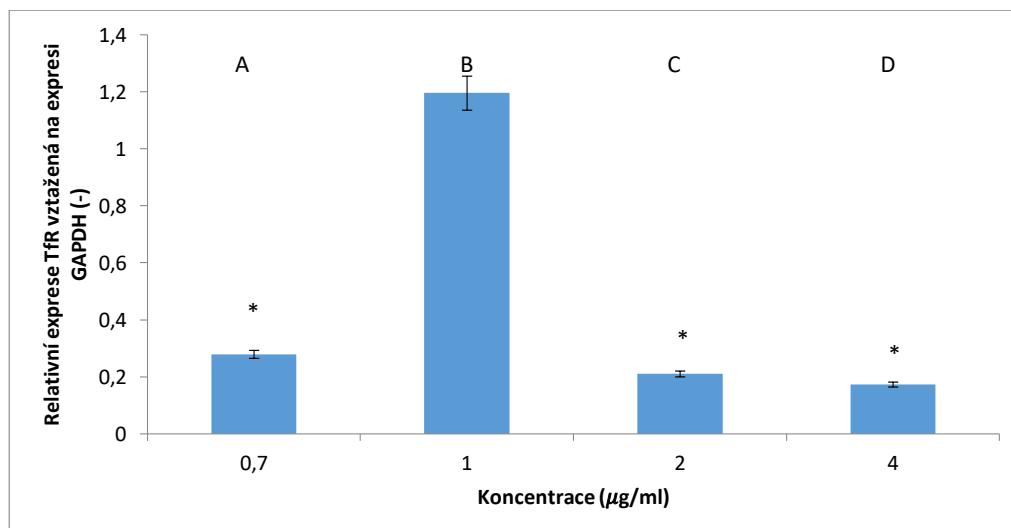


Obr. 5.2: Optimalizace nanášecího pufru u vzorků nanesených do jamky gelu pomocí exprese TfR1 (transferinový receptor) o velikosti přibližně 84 kDa. N–neredukující, nedenaturační; R–redukující, nedenaturační; N95–neredukující, denaturační (inkubace při 95 °C 5 min); R95–redukující, denaturační (inkubace při 95 °C 5 min). GAPDH (přibližně 37 kDa) – housekeeping protein.* určuje statisticky významný rozdíl detekce TfR1 v porovnání s detekcí u vzorku inkubovaného v neredukujících nedenaturačních podmínkách.

5.3 Optimalizace ředění primární protilátky

Posledním optimalizačním krokem pro studium exprese TfR1 bylo stanovení optimálního ředění primární protilátky proti TfR1. Protilátka o koncentracích 0,7; 1,0; 2,0 a 4,0 $\mu\text{g/ml}$ byla připravena v protilátkovém pufru obsahujícím BSA a azid sodný pro stabilitu při dlouhodobém uchovávání protilátky.

Obrázek 5.3 ukazuje výsledky detekce TfR1 v závislosti na ředění primární protilátky. Pro optimalizaci bylo použito 0,7 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 5.3A, relativní exprese TfR1 0,3), 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 5.3B, relativní exprese TfR1 1,2), 2,0 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 5.3C, relativní exprese TfR1 0,2) a 4,0 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 5.3D, relativní exprese TfR1 0,2). Z výsledků je patrné, že příliš vysoká koncentrace protilátky (Obrázek 5.3D, relativní exprese TfR1 0,2) snižuje detekci TfR1, protože je možné pozorovat nespecifickou interakci této protilátky s proteiny o jiných velikostech. Se snižující se koncentrací primární protilátky bylo pozorováno snížení těchto nespecifických interakcí a tím zvýšení citlivosti detekce TfR1. Při použití ještě nižší koncentrace primární protilátky (0,7 $\mu\text{g/ml}$) již byla citlivost detekce TfR1 opět nižší



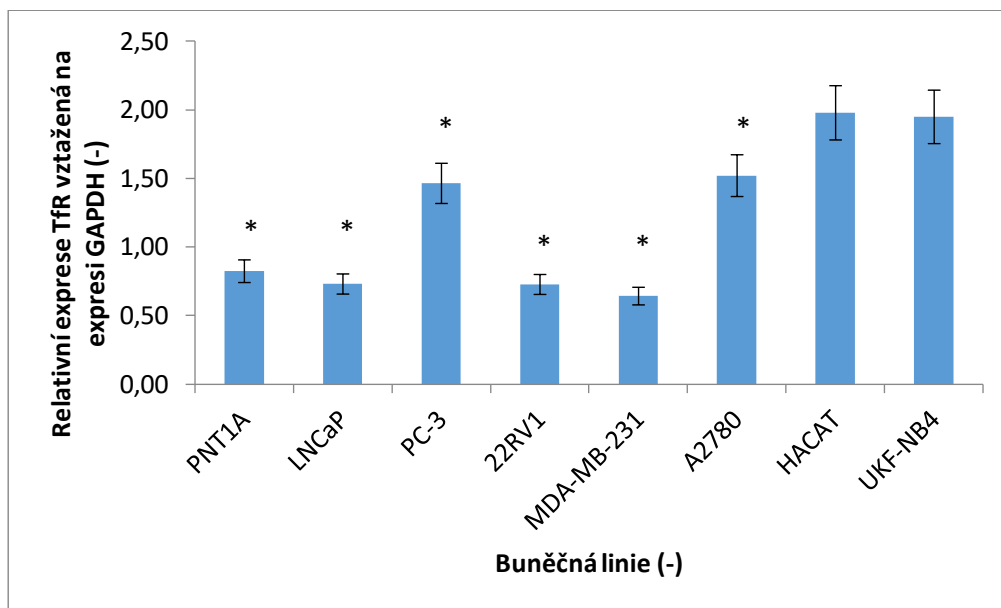
Obr. 5.3: Optimalizace ředění primární protilátky (proti TfR1) u vzorků nanesených do jamky gelu pomocí exprese TfR1 o velikosti přibližně 84 kDa. A) 0,7 μg/ml; B) 1,0 μg/ml; C) 2,0 μg/ml; D) 4,0 μg/ml. GAPDH (přibližně 37 kDa) – housekeeping protein. * určuje statisticky významný rozdíl detekce TfR1 v porovnání s detekcí u vzorku s koncentrací primární protilátky 1,0 μg/ml.

(relativní exprese TfR1 0,3). Jako optimální koncentrace primární protilátky proto byl pro všechny následné experimenty použit 1,0 μg/ml (relativní exprese TfR1 1,2).

5.4 Studium exprese transferinového receptoru u různých buněčných linií

Pro studium exprese transferinového receptoru byly použity optimalizované podmínky z předešlých kroků, tedy vzorek o počtu 50 000 buněk nanášen v neredukujících nedenaturačních podmínkách, primární protilátka byla ředěna na koncentraci 1 μg/ml.

Obrázek 5.4 ukazuje výsledek exprese transferinového receptoru v závislosti na použité buněčné linii. Pro experimenty byly použity následující: PNT1A – buňky zdravé prostaty (relativní exprese TfR1 0,8); LNCaP – nádor prostaty (relativní exprese TfR1 0,7); PC-3 – nádor prostaty androgen nezávislý (relativní exprese TfR1 1,4); 22RV1 – nádor prostaty (relativní exprese TfR1 0,7); MDA-MB-231 – nádor prsu (relativní exprese TfR1 0,6); A2780 – karcinom vaječníků (relativní exprese TfR1 1,5); HACAT – buňky zdravé kůže (relativní exprese TfR1 2,0); UKF-NB4 – neuroblastom (relativní exprese TfR1 1,9). * označuje, statisticky významný rozdíl (na hladině významnosti 5 %) mezi neuroblastomem a ostatními nádory.



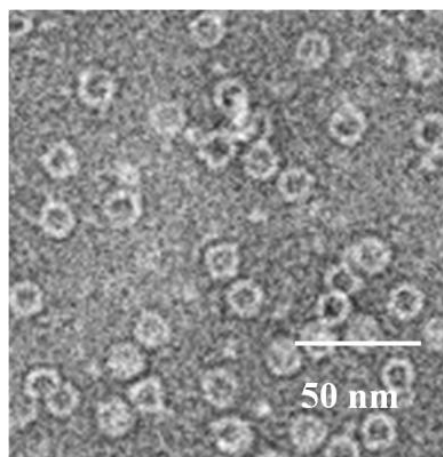
Obr. 5.4: Relativní exprese TfR1 u různých buněčných linií. PNT1A – buňky zdravé prostaty; LNCaP – nádor prostaty; PC-3 – nádor prostaty androgen nezávislý; 22RV1 – nádor prostaty; MDA-MB-231 – nádor prsu; A2780 – karcinom vaječníků; HACAT – buňky zdravé kůže; UKF-NB4 – neuroblastom. * určuje statisticky významný rozdíl relativní exprese TfR1 v porovnání s expresí u UKF-NB4 buněk.

Z výsledků je patrné, že TfR1 v nejvyšší míře exprimuje z nádorových buněčných linií neuroblastom a buňky zdravé kůže. Nejvyšší relativní exprese TfR1 (2,0) byla nalezena u zdravých buněk kůže. Tato exprese byla dokonce vyšší než v případě všech použitých nádorových linií (s nejvyšší mírou relativní exprese TfR1 1,9 u neuroblastomu). Tato skutečnost ukazuje, že apoferritin není vhodným nanotransportérem pro transdermální léčbu povrchových nádorů, u kterých by mohlo dojít ke kontaktu právě se zdravými buňkami kůže. Navíc kvůli změně struktury apoferritinu v nízkém pH není vhodné ani jeho orální podání, kdy by mohlo dojít k jeho rozvolnění v nízkém pH žaludku [27]. Je proto nutné jeho intravenózní podání. Enkapsulace léčiva do nanotransportéru je ale nejvíce potřebná právě v případě intravenózního podání, kdy léčivo během cirkulace v krevním oběhu přichází do kontaktu s nejvyšším množstvím zdravých tkání [5].

Pro další experimenty byly vybrány 3 buněčné nádorové linie: UKF-NB4 – neuroblastom (relativní exprese TfR1 1,9); PC-3 – nádor prostaty androgen nezávislý (relativní exprese TfR1 1,4) a MDA-MB-231 – nádor prsu (relativní exprese TfR1 0,6), aby reprezentovaly různé míry exprese transferinového receptoru.

5.5 Charakterizace apoferritinu

Jako apoferritin je označována proteinová klec složená z 24 podjednotek, do které se sebesestavuje ferritin, pokud neobsahuje ve svojí struktuře železo. Ferritin představuje protein, který je široce distribuován u zvířat za účelem skladování železa [27]. I přesto, že se dutina přirozeně používá pro skladování iontů železa, uměle může být použita pro přenos jakékoliv molekuly. Díky své velikosti může apoferritin využít výše zmíněné zvýšené permeability a retence nádorů pro akumulaci do nádorové tkáně [33]. Pro průnik z nádorové tkáně dále do jednotlivých buněk nádoru lze využít transferinový receptor TfR1, který je ve zvýšené míře neoplastickými buňkami exprimován na povrchu jejich cytoplazmatické membrány. Směs apoferritinových podjednotek a molekul doxorubicinu vytváří základní roztok pro proces zapouzdření. Apoferritin je tak ideálním přenašečem protinádorového léčiva i vzhledem ke své biokompatibilitě, vysoké symetrii, rozpustnosti a stabilitě, uniformitě a snadnosti genetické a chemické manipulace [27].

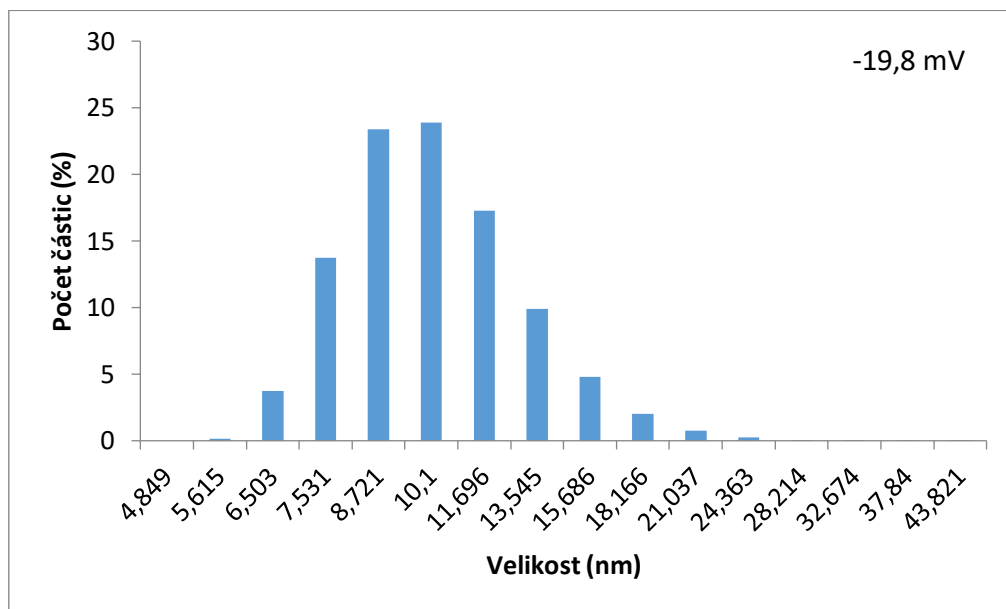


Obr. 5.5: Transmisní elektronová mikroskopie s negativním barvením apoferritinu.

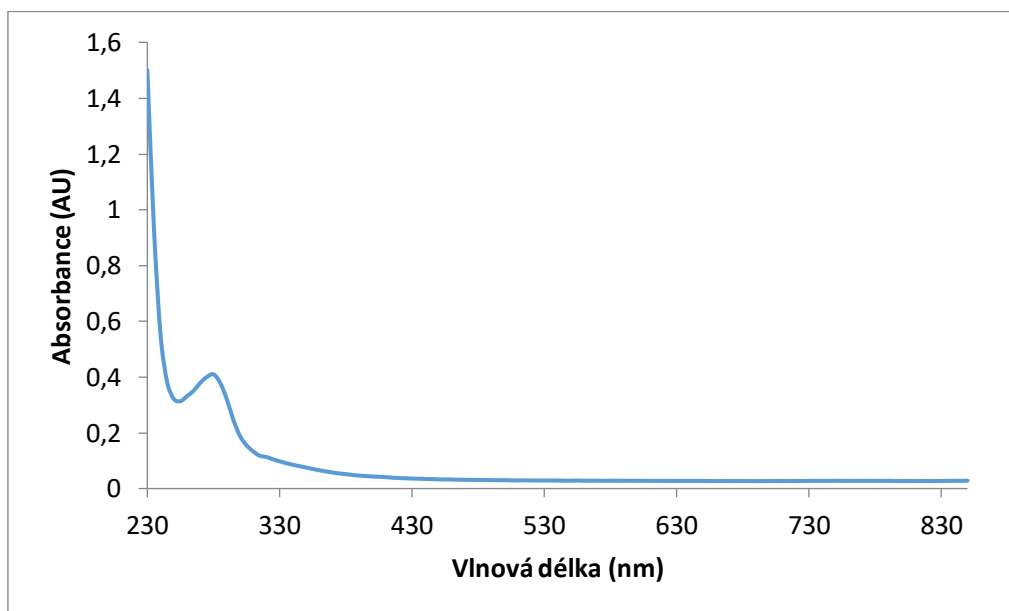
Struktura duté proteinové klece byla ověřena pomocí transmisního elektronového mikroskopu (Obrázek 5.5). Velikost molekuly byla očekávána v průměru 10-12 nm [33], což je velikost, kterou měla většina částic (24 %) (Obrázek 5.6). Nanočástice o průměru pod 100 nm mohou využít EPR efektu v nádorových tkáních, takže se mohou snadno dostat do nepravidelně rozšířených a netěsných nádorových cév s relativně velkými póry. Oproti tomu nanočástice do 10 nm mohou být odstraněny extravazací z normálních cév a renální clearance [36].

Metodou měření dynamického rozptylu světla byla změřena nejen velikost, ale i povrchový náboj apoferritinu. Pro nanotransportér by měl povrchový náboj dosahovat mírně záporných hodnot, aby mohl využít EPR efektu, a zároveň ne příliš záporných, aby nebyl vychytáván RES [37].

Právě tyto vlastnosti byly pozorovány u nanotransportéru na bázi apoferritinu o povrchovém náboji (též zetapotenciál) $-19,8\text{ mV}$ (Obrázek 5.6). Vzhledem ke svým ideálním vlastnostem, byl apoferritin použit jako nanotransportér pro enkapsulaci protinádorového léčiva doxorubicinu.



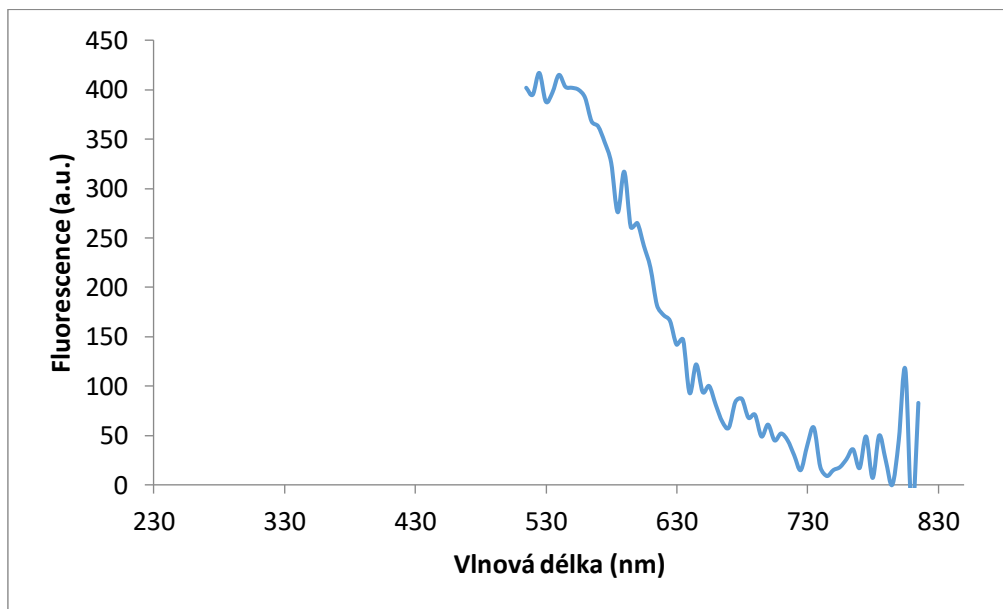
Obr. 5.6: Rozložení velikostí částic apoferritinu.



Obr. 5.7: Spektrum absorbance apoferritinu.

Dále byly charakterizovány optické vlastnosti apoferritinu. Na absorpčním spektru (Obrázek 5.7) je zřejmé, že molekuly apoferritinu absorbují pouze v UV oblasti

(se specifickou absorbancí aromatických aminokyselin při 280 nm). Vzhledem k podmínkám použitým pro detekci doxorubicinu (vizte dále) byla také studována fluorescence apoferritinu při excitační vlnové délce 480 nm (Obrázek 5.8). Je zřejmé, že samotný apoferritin za těchto podmínek žádnou fluorescenci nevykazoval.



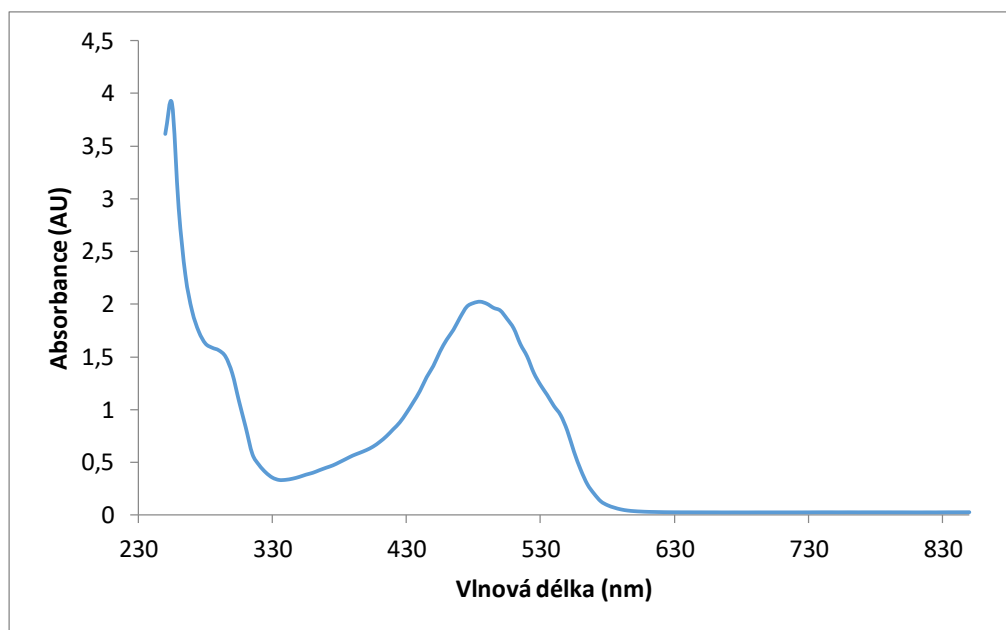
Obr. 5.8: Fluorescenční spektrum apoferritinu při excitaci světlem o vlnové délce 480 nm.

5.6 Charakterizace doxorubicinu

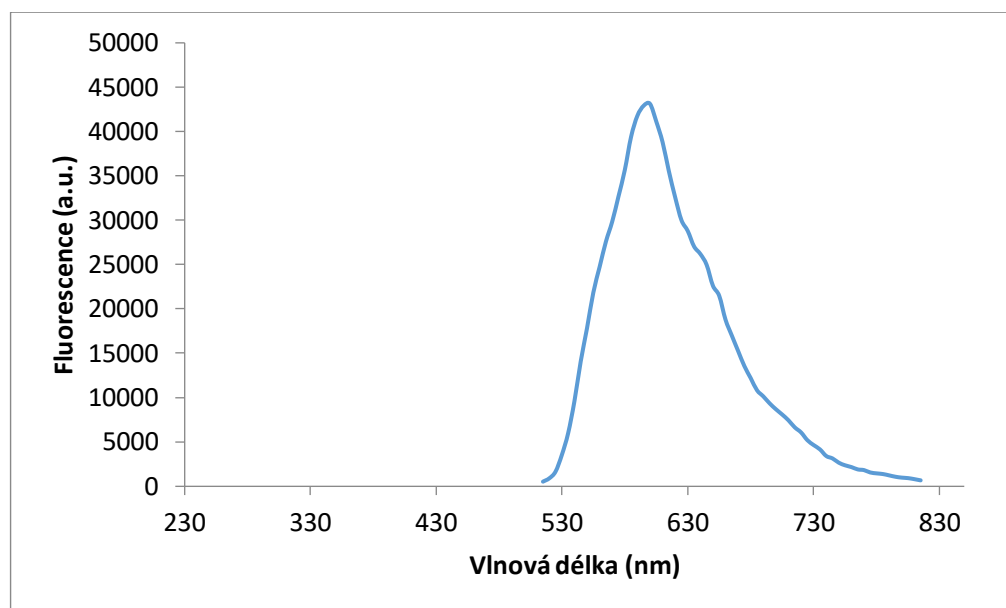
Doxorubicin je vzhledem ke svojí vysoké kardiotoxicitě [5] jedním z cytostatik, pro které je vysoce efektivní využití nanotransportéru, jež snižují interakci cytostatika s buňkami zdravých orgánů. Doxorubicin má také díky svojí struktuře charakteristické optické vlastnosti s absorbančním maximem při 480 nm (Obrázek 5.9) a fluorescenčním maximem při 600 nm (Obrázek 5.10).

Díky těmto charakteristickým optickým vlastnostem je možné doxorubicin detekovat, a to i po jeho enkapsulaci do nanotransportéru. Nejdříve byla změřena absorbance a fluorescence různých koncentrací doxorubicinu. Z obrázku 5.11 je zřejmé, že závislost absorbance doxorubicinu na jeho koncentraci je lineární, a to až do koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Pro fluorescenci tato linearita neplatí (Obrázek 5.12). U nižších koncentrací je závislost logaritmická. Při vyšších koncentracích (od 200 $\mu\text{g/ml}$) dokonce dochází vlivem vysoké koncentrace ke samozhášení fluorescence doxorubicinu. Je proto zřejmé,

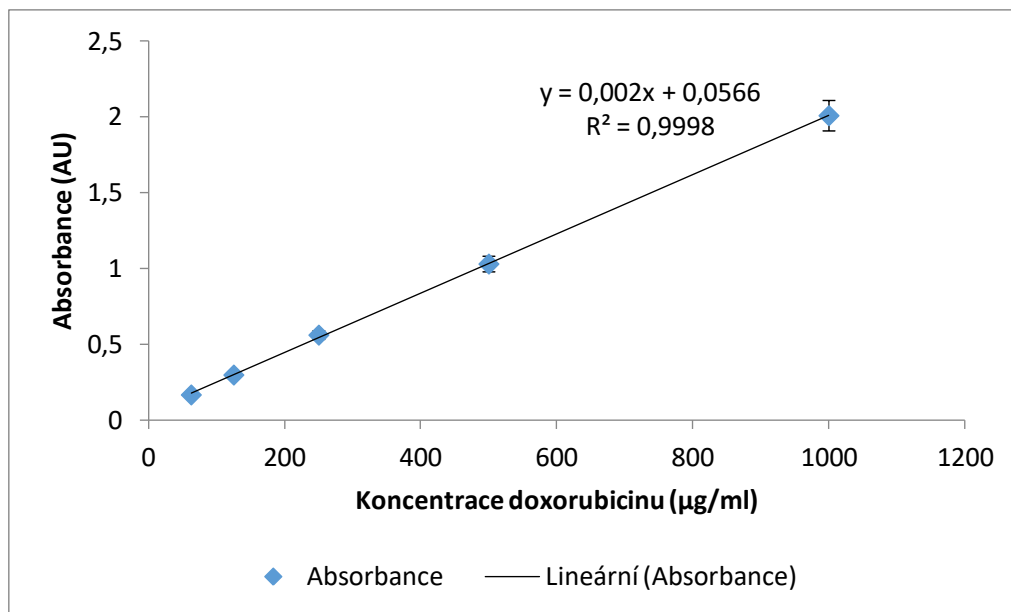


Obr. 5.9: Spektrum absorbance pro volný doxorubicin o koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$.

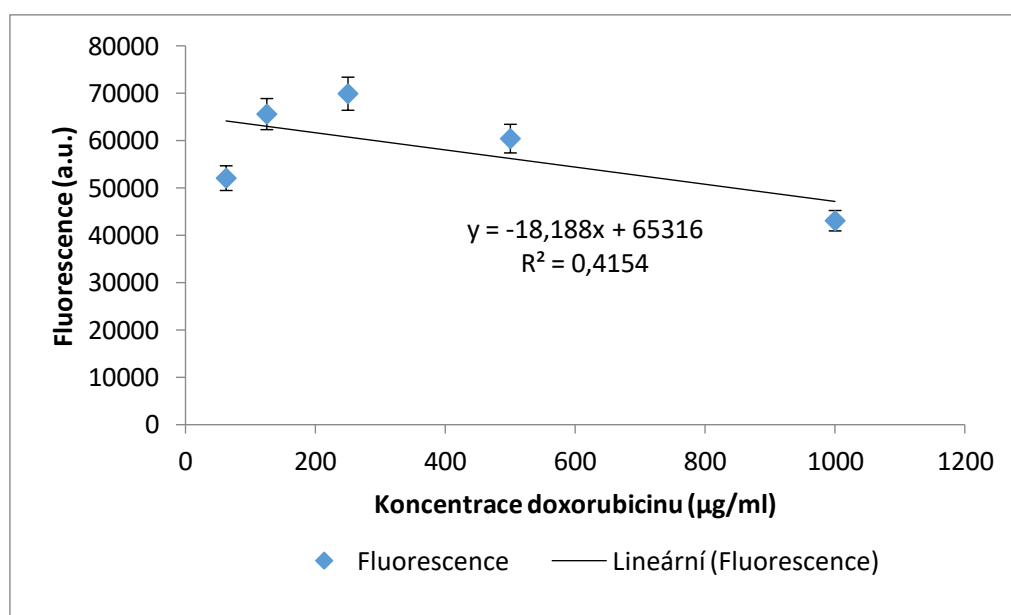


Obr. 5.10: Spektrum fluorescence pro volný doxorubicin o koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$ při excitaci světlem o vlnové délce 480 nm.

že absorbance je pro určení vysoké koncentrace doxorubicinu ideální, a je lineární v celém použitém rozsahu koncentrací (Obrázek 5.11).



Obr. 5.11: Graf závislosti absorbance doxorubicinu na jeho koncentraci.

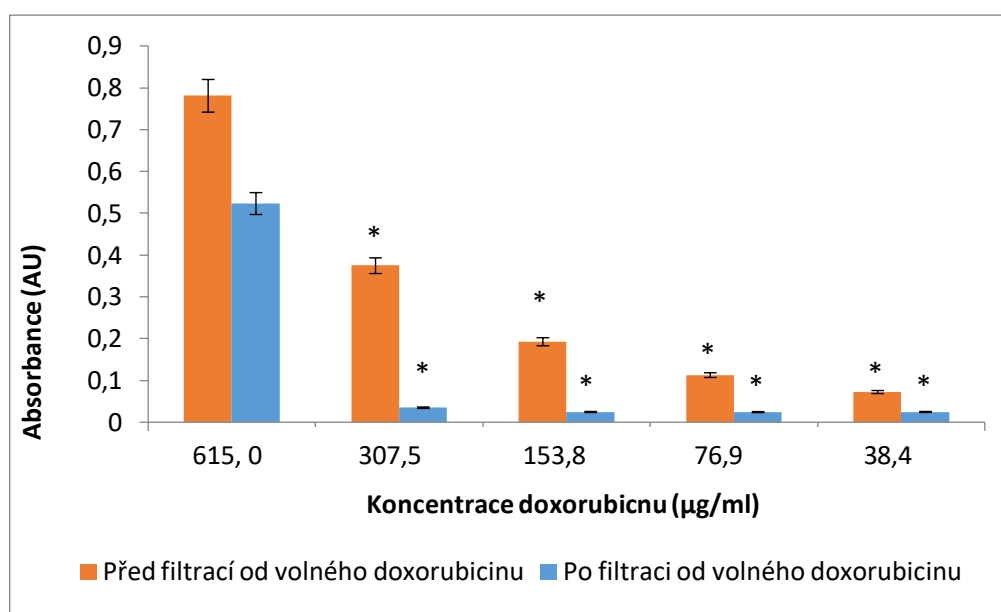


Obr. 5.12: Graf závislosti fluorescence doxorubicinu na jeho koncentraci při excitaci světlem o vlnové délce 480 nm.

5.7 Enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu

V dalším experimentu byla sledována enkapsulační výtěžnost apoferritinu pro různé koncentrace doxorubicinu. Toto léčivo bylo do apoferritinu enkapsulováno pomocí změny jeho struktury vlivem okolního pH. Hlavní výhodou apoferritinu je schopnost reverzibilní disociace a asociace v závislosti na okolním pH, díky čemuž mohou

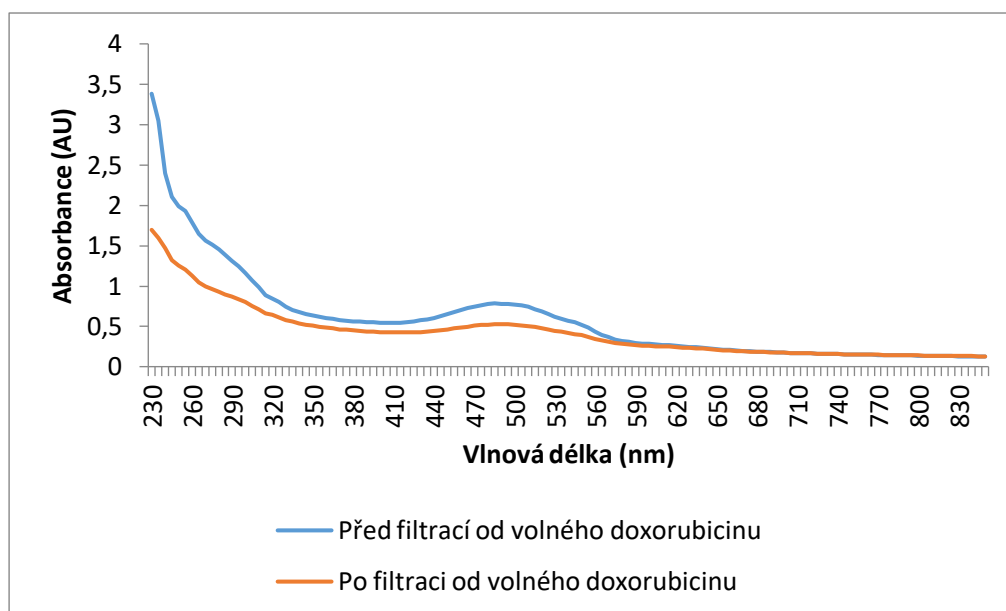
být malé molekuly léčiva snadno a efektivně enkapsulovány do vnitřní dutiny feritinu bez použití jakýchkoliv organických rozpouštědel [27]. Struktura apoferritinu je za fyziologických podmínek uzavřena, zatímco snížením pH do vysoce kyselé oblasti ($\text{pH} < 3,14$) nebo v přítomnosti hydrolyzačních enzymů je protein rozložen na podjednotky. Směs apoferritinových podjednotek a molekul doxorubicinu vytváří základní roztok pro proces zapouzdření. Zvýšením hodnoty pH tohoto roztoku je struktura apoferritinu opět sestavena, přičemž molekuly doxorubicinu jsou zapouzdřeny uvnitř dutiny [34].



Obr. 5.13: Graf spektrofotometricky detekovaného množství enkapsulovaného doxorubicinu v apoferritinovém nanotransportéru v závislosti na množství aplikovaného doxorubicinu k apoferritinu. * určuje statisticky významný rozdíl absorbance doxorubicinu o koncentraci $615,0 \mu\text{g/ml}$ v porovnání s absorbancemi doxorubicinu o nižších koncentracích.

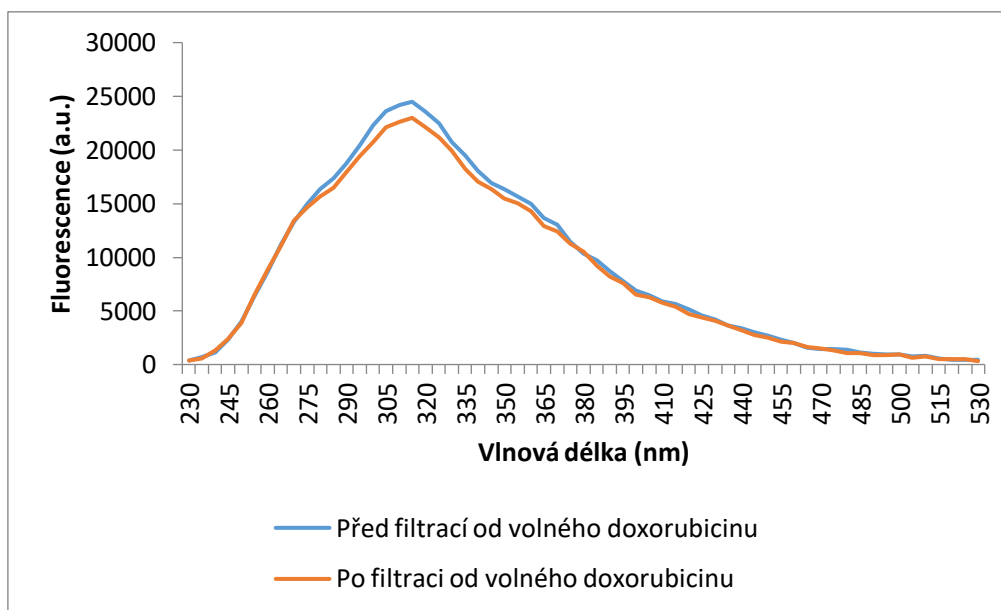
Přidáním HCl došlo ke změně pH ve smyslu okyselení roztoku ($\text{pH } 2,4-2,7$), tedy k rozložení apoferritinu na podjednotky. Po přidání NaOH došlo ke změně pH zpět do neutrálních, nebo mírně zásaditých hodnot ($\text{pH } 7,0-7,6$) – apoferritin se uzavřel do jednoho celku. Zároveň došlo k enkapsulaci volného doxorubicinu do jeho struktury. Tuto molekulu apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem označujeme jako apodox. Vzhledem ke svojí vysoké molekulové hmotnosti apodox za mírného zvýšení gravitační síly centrifugací při $6000\times g$ sedimentuje, a je tak možné tímto způsobem odfiltrovat volný doxorubicin, stejně jako apoferritin bez enkapsulovaného doxorubicinu. Bylo použito 5 různých koncentrací doxorubicinu. Množství enkapsulovaných molekul do struktury apoferritinu bylo pozorováno na základě změny

absorbance. Z grafu (5.13) lze pozorovat, že enkapsulační výtěžnost apoferritinu je signifikantně závislá na koncentraci doxorubicinu. Zatímco u aplikované koncentrace doxorubicinu $615,0 \mu\text{g/ml}$ je po filtraci od volného doxorubicinu možné pozorovat velké množství molekul doxorubicinu, které jsou enkapsulovány v apoferritinu, u nižších koncentrací tomu tak není. Množství enkapsulovaných molekul doxorubicinu bylo u použití jeho nižších koncentrací příliš nízké, a nedošlo tak k sedimentaci apodox při centrifugaci, protože měl příliš malou molekulovou hmotnost. Je proto vidět, že v těchto vzorcích nebylo možné doxorubicin detekovat, protože byl odfiltrován. Enkapsulační výtěžnost při použití aplikované koncentrace $615,0 \mu\text{g/ml}$ byla 67 %. Tato koncentrace tedy byla vyhodnocena jako optimální a byla proto použita pro všechny další experimenty.



Obr. 5.14: Absorpční spektra apodox o koncentraci $615,0 \mu\text{g/ml}$ před filtrací od volného doxorubicinu a po ní.

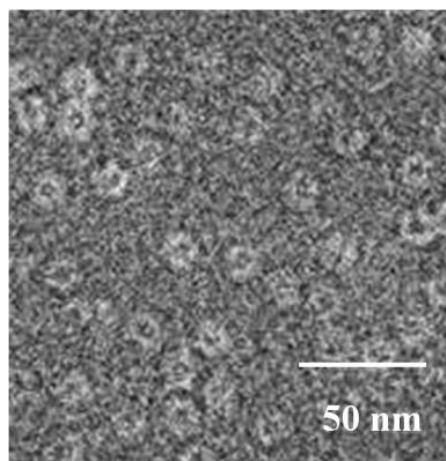
Ihned po enkapsulaci doxorubicinu do apoferritinu lze pozorovat změnu absorpčního spektra apoferritinu (Obrázek 5.7), ve kterém se projevuje charakteristická absorbance doxorubicinu (Obrázek 5.9). Z původního spektra apoferritinu, kdy je absorbance od vlnové délky 430 nm téměř nulová se po enkapsulaci doxorubicinu začne projevovat jeho absorpční spektrum – s píkem při 480 nm. Výsledkem je spektrum apodox, kdy je pík 480 nm zachován (Obrázek 5.14). Po filtraci neenkapsulovaného doxorubicinu je možné vidět snížení jeho absorbance v nanotransportéru (o 23 %).



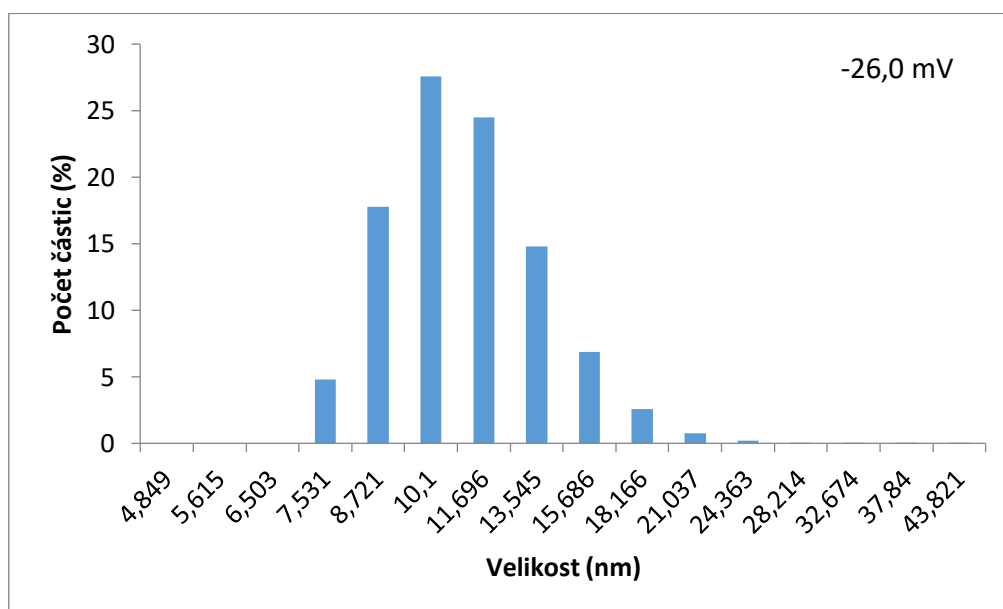
Obr. 5.15: Fluorescenční spektra apodox o koncentraci $615,0 \mu\text{g/ml}$ před filtrací od volného doxorubicinu a po ní.

Ihned po enkapsulaci doxorubicinu do apoferritinu lze pozorovat také změnu fluorescenčního spektra apoferritinu (Obrázek 5.8), ve kterém se projevuje charakteristická fluorescence doxorubicinu (Obrázek 5.10). Z původního spektra apoferritinu se po enkapsulaci doxorubicinu začne projevovat jeho fluorescenční spektrum – excitace při 600 nm. Výsledkem je spektrum apodox (Obrázek 5.15). Po filtraci neenkapsulovaného doxorubicinu je možné vidět snížení jeho fluorescence v nanotransportéru.

Po enkapsulaci optimální koncentrace doxorubicinu do apoferritinu byly sledovány změny struktury tohoto nanotransportéru. Na snímku z transmisního elektronového mikroskopu (Obrázek 5.16) je vidět, že si apoferritin zachoval svoji strukturu proteinové klece. Zároveň je ale zřejmé, že vnitřní dutina už není na rozdíl od samotného apoferritinu (Obrázek 5.5) prázdná, ale je vyplněna molekulami doxorubicinu. Pomocí dynamického rozptylu světla bylo zjištěno, že apoferritin nezměnil svoji velikost. Došlo však ke změně jeho negativního povrchového náboje, který se zvýšil z $-19,8 \text{ mV}$ (Obrázek 5.6) na $-26,0 \text{ mV}$ (Obrázek 5.17). To ukazuje na skutečnost, že některé molekuly doxorubicinu byly při enkapsulaci navázány i na povrch apoferritinu a nedošlo pouze k jejich enkapsulaci do jeho dutiny. Množství těchto doxorubicinových molekul na vnějším povrchu apoferritinu je ale natolik malé, že nezměnilo celkovou velikost apoferritinu. Stejně jako v samotném apoferritinu (Obrázek 5.6), i u částic apodox se změřená velikost částic pohybovala v nejvyšším zastoupení v rozmezí 10-12 nm (Obrázek 5.17).



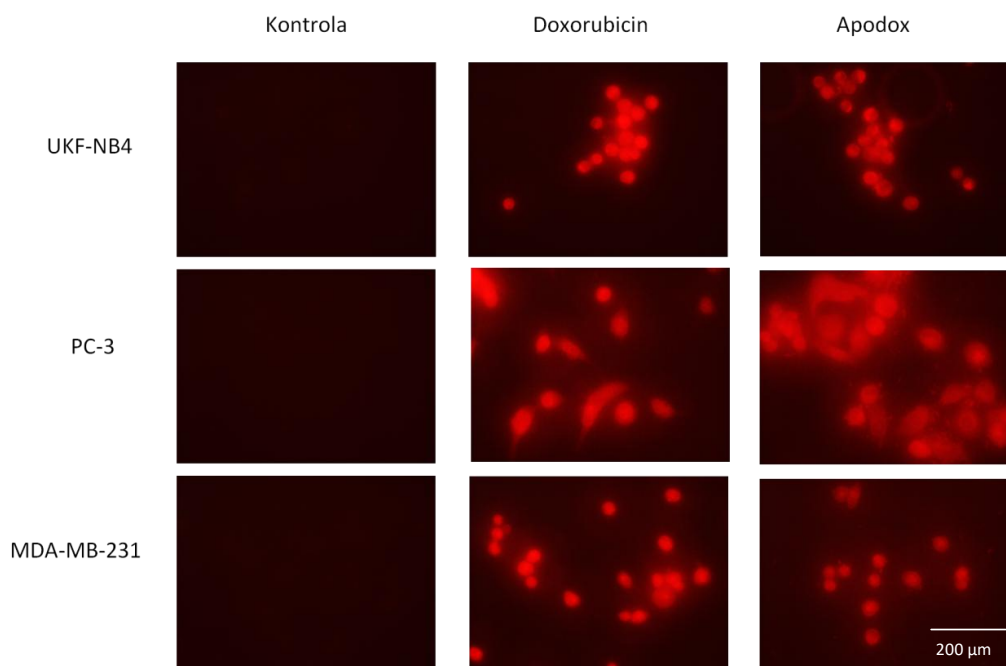
Obr. 5.16: Transmisní elektronová mikroskopie s negativním barvením apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem – apodox.



Obr. 5.17: Rozložení velikostí částic apodox.

5.8 Krátkodobý vliv apodox na buňky s různou mírou exprese transferinového receptoru

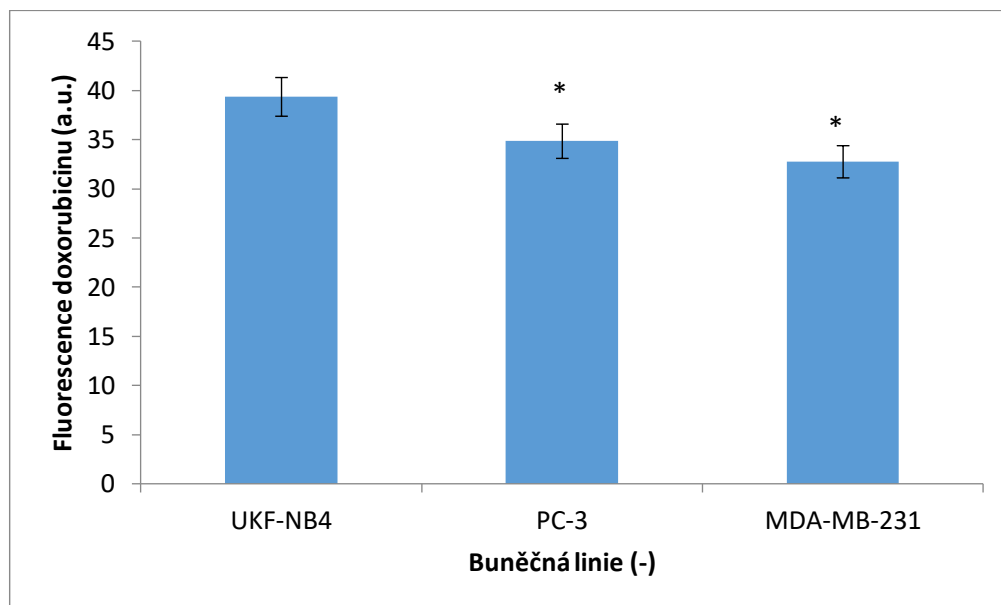
Díky optickým vlastnostem doxorubicinu bylo možné fluorescenční mikroskopií sledovat jeho internalizaci do nádorových buněk s různou expresí transferinového receptoru. Na kontrolním vzorku neléčených buněk nelze vidět žádnou autofluorescenci (Obrázek 5.18). Volný doxorubicin nejvíce svítí v nádorové buněčné linii s vysokou expresí transferinového receptoru (linie UKF-NB4, 39 AU).



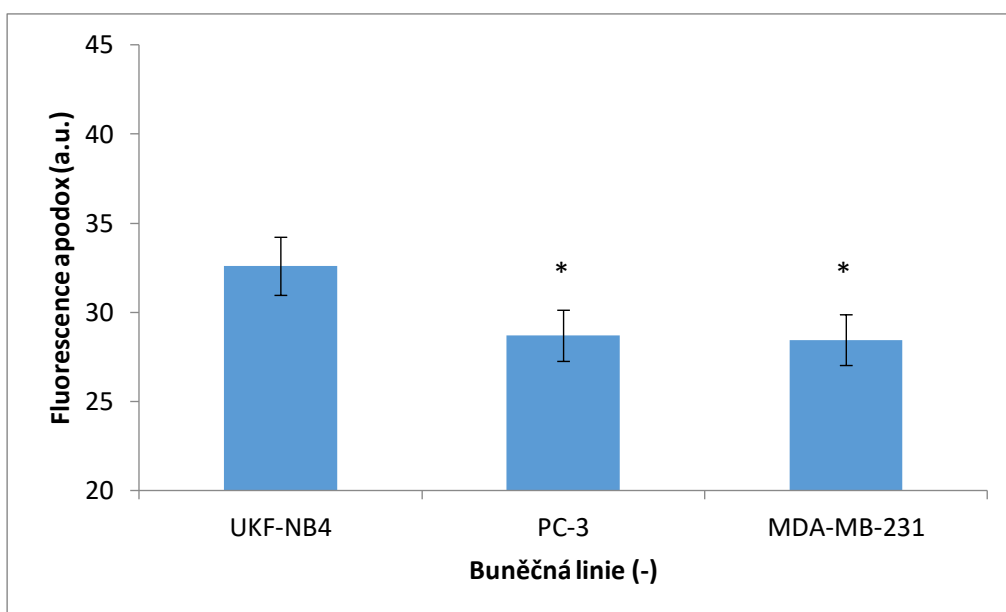
Obr. 5.18: Fluorescenční mikroskopie ukazující fluorescenci doxorubicinu a doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu (apodox) v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru v porovnání s autofluorescencí neléčených buněk (Kontrola).

U léčby apodox byla předpokládána vyšší závislost internalizace apodox do buněk v závislosti na dané buněčné linii. Neoplastické buňky v různé míře exprimují na povrch cytoplazmatické membrány specifické antigeny, sloužící pro uspokojení vyšších metabolických potřeb těchto buněk. Typickými příklady těchto antigenů jsou transferinové receptory. Tohoto bylo využito zacílením povrchu nanotransportérů na TfR1 receptory, díky čemuž takto specificky cílené nanotransportéry vstupovaly právě do nádorových buněk [26]. Čím byla vyšší exprese transferinového receptoru – nejvyšší u linie UKF-NB4 –, tím byla pozorována vyšší internalizace nanotransportérů a jejich obsahu do buněk (Obrázek 5.20, 33 AU). Rozdíl mezi nádorovými buněčnými liniemi s nejvyšší a nejnížší expresí TfR1 je statisticky významný.

Jelikož internalizace volného doxorubicinu a apodox vykazovala při krátkodobém vlivu stejný trend – závislost internalizace na míře exprese TfR1 – byl sledován i dlouhodobý vliv v následující kapitole.



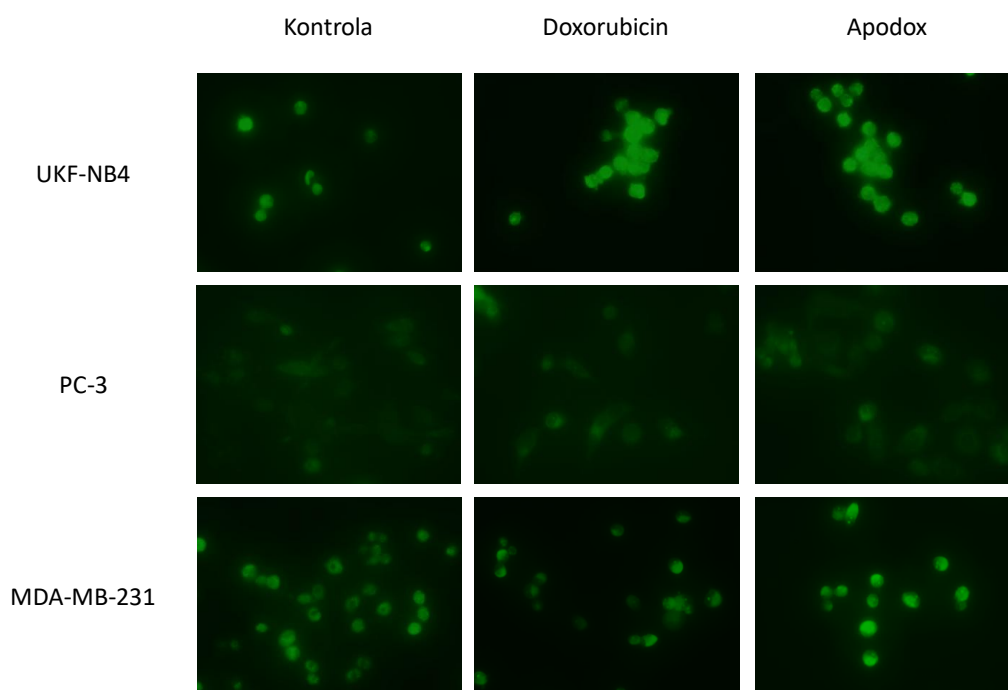
Obr. 5.19: Číselné vyjádření fluorescence doxorubicinu v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl fluorescence UKF-NB4 v porovnání s fluorescencí ostatních nádorových buněčných linií.



Obr. 5.20: Číselné vyjádření fluorescence apodox v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl fluorescence UKF-NB4 v porovnání s fluorescencí ostatních nádorových buněčných linií.

Rozdíl mezi střední a nízkou expresí transferinového receptoru pro internalizaci doxorubicinu je zanedbatelný (35 AU pro buněčnou linii se střední mírou exprese TfR1 a 33 AU pro buněčnou linii s nízkou mírou exprese TfR1), což potvrzuje obrázek 5.19. Míra internalizace volného doxorubicinu by na nádorové buněčné linii neměla záviset, protože doxorubicin do buněk vstupuje prostou difúzí, nikoli v závislosti na míře exprese TfR1, jak je tomu u apodox.

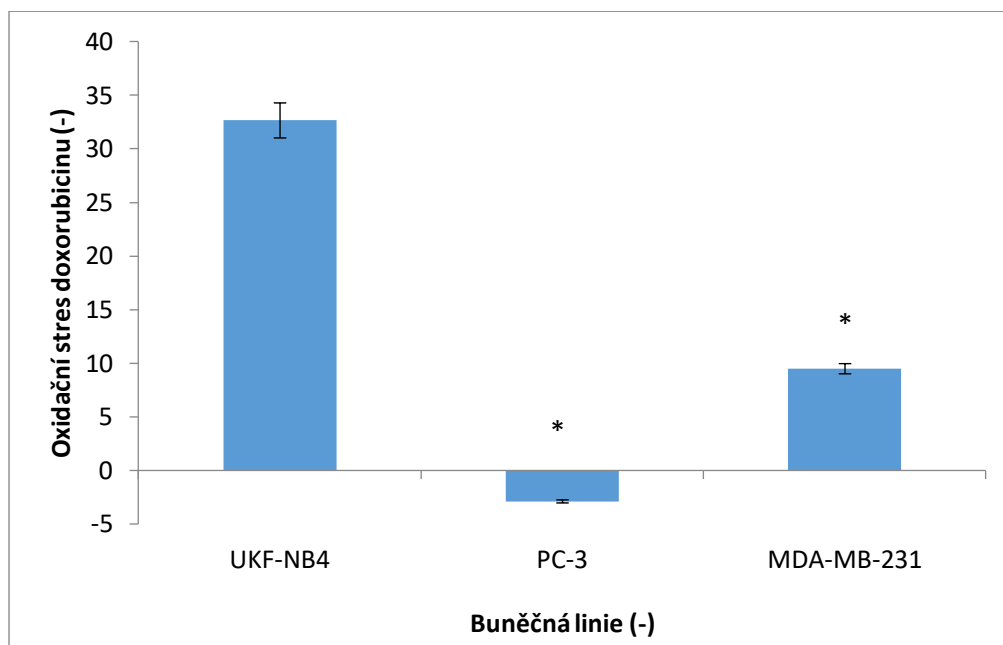
Jak již bylo ukázáno v obrázku 5.10, fluorescence doxorubicinu při jeho vysokých koncentracích nemusí být spolehlivá, pro vyhodnocení úspěšnosti léčby apodox a doxorubicinem byl proto sledován samotný oxidační stres působící na buňky (Obrázek 5.21). Oxidační stres je mechanismus, kterým doxorubicin, a tím i apodox eliminují nádorové buněčné linie.



Obr. 5.21: Fluorescenční mikroskopie ukazující míru oxidačního stresu při léčbě doxorubicinem a apodox v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru v porovnání s oxidačním stresem neléčených buněk (Kontrola).

Na obrázku 5.21 lze pozorovat oxidační stres u jednotlivých nádorových linií v závislosti na použitém léčivu. Kontrolní buňky jsou sice neléčené, přesto oxidační stres vykazují. Oxidační stres vzniká jako vedlejší produkt látkové přeměny, okysličování, odbourávání a detoxikace reaktivních meziproductů. Proto je zřejmé, že tento stav lze pozorovat i u fyziologických buněk. Po aplikaci apodox a volného doxorubicinu byla očekávána zvýšená míra oxidačního stresu, zelená barva na obrázcích 5.21 by

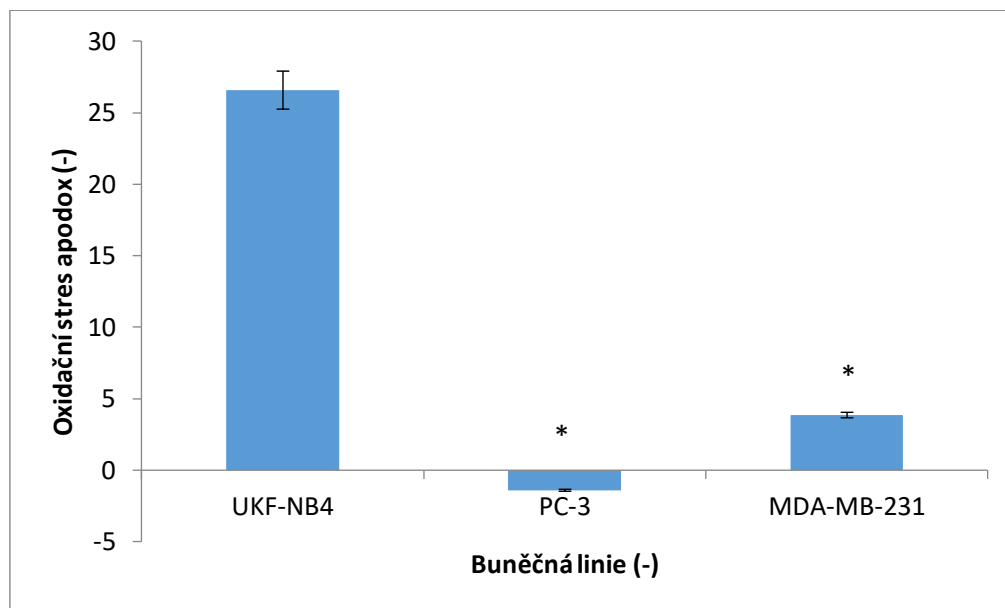
tedy měla svítit výrazněji než u kontrolních vzorků. U číselného vyjádření oxidačního stresu při aplikaci volného doxorubicinu lze u nádorové linie nádoru prostaty PC-3 pozorovat po odečtení oxidačního stresu kontrolních buněk zápornou hodnotu oxidačního stresu (Obrázek 5.22). Buněčná linie tedy nevykazovala známky zvýšeného oxidačního stresu vlivem léčby.



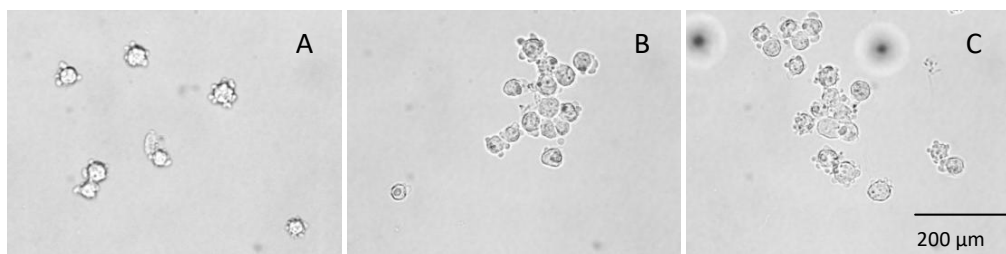
Obr. 5.22: Číselné vyjádření oxidačního stresu způsobeného volným doxorubicinem v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl oxidačního stresu UKF-NB4 v porovnání s oxidačním stresem ostatních nádorových buněčných linií.

Obrázek 5.23 potvrzuje předpoklad, že nádorové buněčné linie s vysokou expresí transferinového receptoru léčené pomocí apodox vykazují vyšší míru oxidačního stresu než nádorové buněčné linie s nízkou expresí tohoto receptoru. To je způsobené vyšším množstvím léčiva apodox, který přes vyšší množství transferinových receptorů snáze pronikl do buněk a mohl zde spustit apoptózu, tedy smrt buněk, která je vyvolána oxidačním stresem.

Na snímcích z ambientní mikroskopie byl pozorován různý krátkodobý vliv apodox na buňky jednotlivých nádorových buněčných liniích. Neuroblastomová buněčná linie UKF-NB4 měla expresi transferinového receptoru nejvyšší, proto byla u této linie očekávána i nejvyšší internalizace apodox do buněk a tím i nejvyšší vliv enkapsulovaného doxorubicinu v tomto nanotransportéru. U doxorubicinu, který do buněk



Obr. 5.23: Číselné vyjádření oxidačního stresu způsobeného apodox v nádorových buněčných liniích s vysokou (linie UKF-NB4), střední (PC-3) a nízkou (MDA-MB-231) expresí transferinového receptoru. * určuje statisticky významný rozdíl oxidačního stresu UKF-NB4 v porovnání s oxidačním stresem ostatních nádorových buněčných linií.



Obr. 5.24: Pozorování změn morfologie buněk neuroblastomové linie UKF-NB4 v ambientním světle bez aplikované inhibiční látky (A), s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem (B) a s aplikovaným 34 μ M doxorubicinem enkapsulovaným v apoferritinu (apodox, C). Na obrázku lze pozorovat typické morfologické znaky apoptózy, jakovje blebbing či tvorba apoptických tělísek.

vstupuje difúzí, byla očekávaná stejná míra jeho internalizace a vlivu u všech použitých buněčných linií.

U neuroblastomu lze pozorovat kontrolní buňky (Obrázek 5.24A), které nebyly ve svém růstu nijak ovlivňovány. Při léčbě volným doxorubicinem (Obrázek 5.24B) byla u buněk pozorována formace černých tělísek uvnitř buňky. Jednalo se o apoptotická tělíska ukazující na to, že vlivem doxorubicinu byly buňky ve stavu apoptózy

neboli naprogramované smrti buňky [3]. Byly také pozorovány výrazné výčnělky membrány, které ukazovaly na ztrátu integrity buněčné membrány [5]. Jak již bylo řečeno v kapitole o doxorubicinu, toto cytostatikum je pro buňky vysoce toxické, vyvolává oxidační stres, který v konečném důsledku vede až k apoptóze [3]. Podobný efekt byl pozorován při léčbě pomocí apodox (Obrázek 5.24C). U neuroblastomových buněk lze tedy krátkodobý účinek volného doxorubicinu srovnat s účinkem doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu.

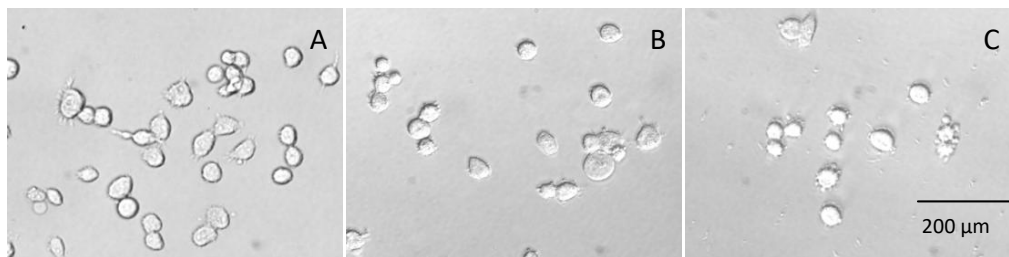


Obr. 5.25: Pozorování změn morfologie buněk z kostní metastázy nádoru prostaty PC-3 v ambientním světle bez aplikované inhibiční látky (A), s aplikovaným $34\mu\text{M}$ doxorubicinem (B) a s aplikovaným $34\mu\text{M}$ doxorubicinem enkapsulovaným v apoferritinu (apodox, C).

U buněk z nádoru prostaty nezávislého na androgenech PC-3 byla zjištěna střední úroveň exprese transferinového receptoru, proto byla předpokládána střední internalizace léčiva v apoferritinu do těchto buněk. Na snímku buněk léčených samotným doxorubicinem (Obrázek 5.25B) lze vidět, že v buňkách došlo opět k vytvoření apoptotických tělísek a byla pozorována i tvorba výčnělků membrány, ukazující na probíhající apoptózu v buňkách. U buněk léčených apoferritinem s enkapsulovaným doxorubicinem (Obrázek 5.25C) je vidět mnohem menší množství apoptotických tělísek i menší množství výčnělků membrány než v případě buněk léčených samotným doxorubicinem.

U nádoru prsu, kde byla zjištěna nízká míra exprese TfR1 receptoru byla očekávána odpovídající internalizace apodox do buněk. Na snímcích byly pozorovány jen nepatrné rozdíly mezi kontrolními buňkami (Obrázek 5.26A) a buňkami léčenými apodox (Obrázek 5.26C). U buněk léčených volným doxorubicinem (Obrázek 5.26B) byla pozorována formace apoptotických tělísek.

Nutno podotknout, že apoferritin sám o sobě žádný negativní vliv na nádorové buňky nemá [38], nelze tedy přisuzovat účinnost léčby apodox spojením doxorubicinu s apoferritinem. Tento nanotransportér slouží pouze pro přenos chemoterapeutika, nezvyšuje jeho účinnost.



Obr. 5.26: Pozorování změn morfologie buněk z plicní metastázy nádoru prsu MDA-MB-231 v ambientním světle bez aplikované inhibiční látky (A), s aplikovaným $34\mu\text{M}$ doxorubicinem (B) a s aplikovaným $34\mu\text{M}$ doxorubicinem enkapsulovaným v apoferritinu (apodox, C).

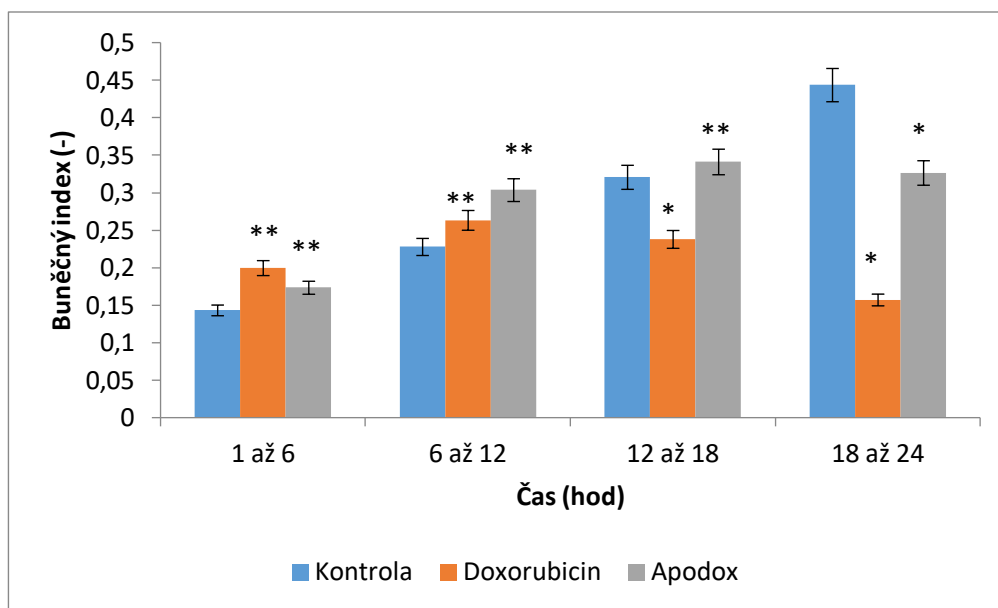
5.9 Dlouhodobý vliv apodox na buňky s různou mírou exprese transferinového receptoru

Jelikož z výsledků sledování krátkodobého vlivu apodox na buňky s různou mírou exprese transferinového receptoru nebyl znatelný rozdíl mezi použitou léčbou (volný doxorubicin vykazoval stejný trend jako apodox), byl sledován i dlouhodobý vliv (po dobu 24 hodin) v této kapitole.

Na přístroji xCELLigence byla sledována životnost buněk po dobu 24 hodin (Obrázek 5.27, Obrázek 5.28 a Obrázek 5.29). Jako kontrola byly použity buňky, které nebyly v růstu nijak ovlivňovány. Ostatní sloupce vyjadřují množství přeživších buněk po léčbě doxorubicinem a apodox. Lze očekávat, že buňky, které nebyly nijak v růstu ovlivňovány, budou vykazovat vzestupnou tendenci růstu. U léčení buněk doxorubicinem, ať už volným nebo v přenašeči, byl očekáván pokles živých buněk.

Buněčná linie UKF-NB4 nejlépe reflektuje očekávání léčby. Přesto se očekávané výsledky – tedy eliminace buněk jak volným doxorubicinem, tak doxorubicinem enkapsulovaným do apoferritinu – dostavují až ve druhém, respektive třetím časovém intervalu (Obrázek 5.27). Zatímco v časovém úseku 1-12 hodin vykazují buňky treatované apodox tendenci růst, ve druhé polovině sledovaného intervalu je již zřejmá eliminace buněk. Po 24 hodinách je počet buněk treatovaných doxorubicinem třetinový oproti kontrolnímu vzorku. Enkapsulovaný doxorubicin vykazuje usmrcení buněk až v posledním šestihodinovém intervalu (30% buněk usmrčených).

Stejně předpoklady pro růst buněk jako u neuroblastomu (Obrázek 5.27) byly i pro buněčnou linii nádoru prostaty PC-3 (Obrázek 5.28). V celém časovém intervalu 24 hodin nastává eliminace buněk volným doxorubicinem. Již v rozmezí 1-6 hodin po začátku léčby je patrné, že apodox má na buňky opačný vliv, než bylo očekáváno a jejich růst podporuje. Rostou dokonce rychleji (v posledním časovém intervalu

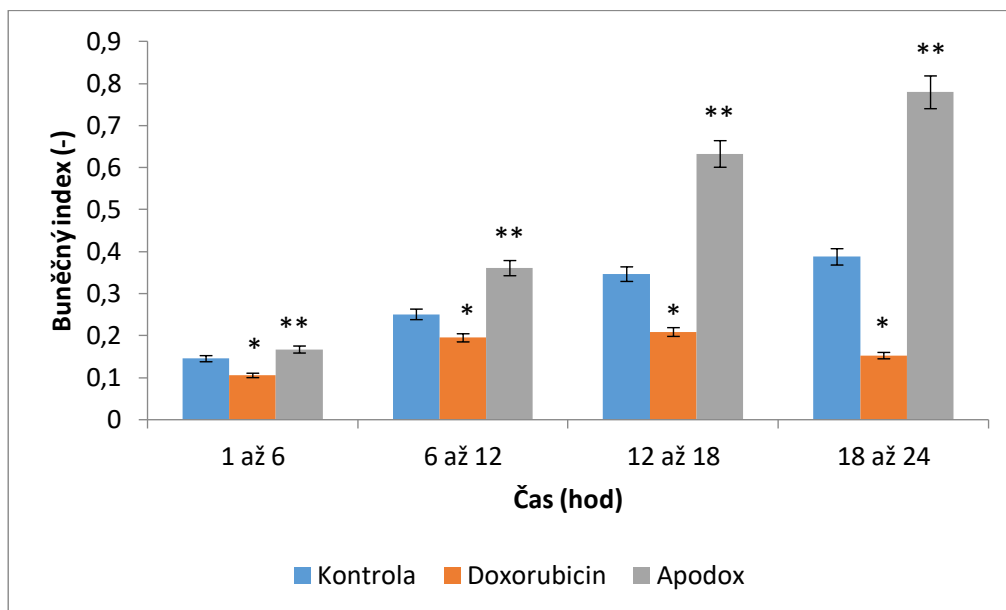


Obr. 5.27: Rychlosti proliferace buněk v časových intervalech po šesti hodinách u buněčné linie UKF-NB4 neléčené a léčené doxorubicinem/apodox. * určuje statisticky významný pokles růstu léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk. ** určuje statisticky významný přírůstek léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk.

nárůst buněk o 200 %), než buňky kontrolní – bez vnějšího zásahu do jejich dělení (Obrázek 5.28). Tento jev lze vysvětlit hormetickým efektem [39].

Hormetický efekt je termín, který toxikologové používají k označení dvoufázové dávkové odpovědi na prostředek v prostředí, který je charakterizován stimulací nízkou dávkou nebo příznivým účinkem a vysokým inhibičním nebo toxickým účinkem. V oblasti biologie a medicíny je hormetický efekt definován jako adaptivní odezva buněk a organismů na mírný (obvykle přerušovaný) stres. Nedávné poznatky objasňují buněčné signální dráhy a molekulární mechanismy, které zprostředkovávají hormonální odezvy, které typicky zahrnují enzymy, jako jsou kinasy a deacetylasy, a transkripční faktory. Výsledkem je, že buňky zvyšují produkci cytoprotektivních a obnovujících proteinů včetně růstových faktorů a antioxidantních enzymů. Lepší porozumění hormonálních mechanismů na buněčné a molekulární úrovni vede k novým přístupům k prevenci a léčbě mnoha různých – tedy i karcinogenních – onemocnění [39].

Z dosažených výsledků je zřejmý významný rozdíl v inhibičním vlivu apodox mezi buněčnými liniemi neuroblastomu (Obrázek 5.27), kdy je patrný pokles buněk po aplikaci apodox v časovém intervalu 18 až 24 hodin, a nádoru prostaty (Obrázek 5.28), u kterého je zřejmý zvýšený růst buněk v celém časovém intervalu

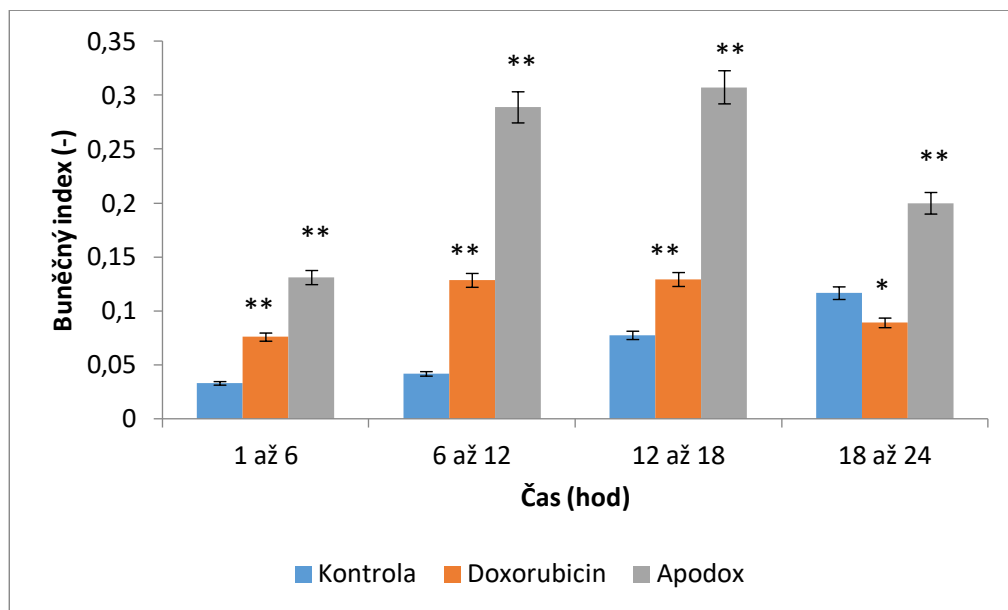


Obr. 5.28: Rychlosti proliferace buněk v časových intervalech po šesti hodinách u buněčné linie PC-3 neléčené a léčené doxorubicinem/apodox. * určuje statisticky významný pokles růstu léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk. ** určuje statisticky významný přírůstek léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk.

po aplikaci apodox ve srovnání s kontrolními neléčenými buňkami. Buňky neuroblastomu byly totiž schopny v závislosti na vyšší míře exprese TfR1 dopravit do buněk vyšší množství apodox, který je po uvolnění doxorubicinu začal eliminovat. U buněk nádoru prostaty je střední míra exprese TfR1, z toho důvodu byly tyto buňky schopny z vnějšího okolí vychytat méně apodox než buňky neuroblastomu s vyšší mírou exprese TfR1. Stejný rozdíl je patrný i mezi buňkami nádoru prostaty a karcinomem prsu.

V obrázku 5.29 jsou zobrazeny čtyři časové úseky po šesti hodinách u nádorové linie karcinomu prsu MDA-MB-231. V celém časovém úseku 24 hod od začátku léčby je patrné, že apodox má na buňky stimulační vliv (v posledním časovém intervalu nárůst buněk o 150 %). Tento jev lze opět připsat hormetickému efektu. I zde se jedná o příliš nízkou koncentraci léčiva, než aby buňky eliminovala. Naopak u nich podněcuje zvýšený růst, buňky tímto spouští ochranný mechanismus [39]. Aby přešly buňky do stavu apoptózy, musela by být použita vyšší dávka respektive vyšší koncentrace apodox.

Z porovnání buněčného indexu v posledním časovém intervalu (18 až 24 hodin) u nádorové buněčné linie neuroblastomu (buněčný index apodox 0,3; Obrázek 5.27), nádoru prostaty (buněčný index apodox 0,8; Obrázek 5.28) a karcinomu prsu (bu-



Obr. 5.29: Rychlosti proliferace buněk v časových intervalech po šesti hodinách u buněčné linie MDA-MB-231 neléčené a léčené doxorubicinem/apodox. * určuje statisticky významný pokles růstu léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk. ** určuje statisticky významný přírůstek léčených buněk v porovnání s růstem kontrolních buněk.

něčný index apodox 0,2; Obrázek 5.29) je patrné, že dlouhodobý vliv apodox na buňky je závislý na míře exprese TfR1.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium exprese transferinových receptorů u různých nádorových buněčných liniích a využitím v nanomedicině. Jedním z cílů této práce bylo sepsání literární rešerše, která diskutuje statistiku nádorových onemocnění, možnosti cílené dopravy léčby nádorových onemocnění v rámci nanomedicíny až po možnosti, které může nabídnout teranostika. V praktické části byla provedena optimalizace počtu buněk, složení nanášecího pufru a koncentrace primární protilátky. Tyto optimalizované podmínky byly použity při samotné detekci exprese transferinového receptoru u různých nádorových buněčných linií. Práce je zaměřena na karcinom prostaty, prsu a neuroblastom – tedy onemocnění, na která aktuálně umírá nejvíce lidí ve vyspělých zemích. Byla zjištěna různá míra exprese v závislosti na typu nádorových buněk.

Pro snížení systémové toxicity chemoterapeutika (doxorubicinu) byl navržen vhodný transportér. Jako ideální se díky svým vlastnostem jeví apoferritin. Jeho velikost v rozmezí 10-12 nm je ideální pro využití EPR efektu, zároveň se vyhne renální clearance. Apoferritinová klec s enkapsulovaným doxorubicinem (apodox) byla detailně charakterizována. Optické vlastnosti volného doxorubicinu, apoferritinu a následného apodox ukázaly, že molekuly si zachovávají i po enkapsulaci své důležité vlastnosti; apoferritin slouží pouze jako nanotransportér, přepravovaný doxorubicin neovlivňuje. Protinádorový efekt apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem byl *in vitro* otestován a získaná data statisticky zpracována.

V závislosti na různé míře exprese transferinového receptoru – což je receptor, kterým je apoferritin vychytáván neoplastickými buňkami – byla sledována i různá míra internalizace apodox do buněk a jeho dlouhodobý vliv na tyto buňky. Tím byl potvrzen předpoklad funkce transferinového receptoru jako mechanismu, kterým do buněk nanotransportér proniká.

Na základě všech získaných výsledků byla potvrzena vhodnost použití apoferritinu jako nanotransportéru pro intravenózní dopravu chemoterapeutických léčiv jinak způsobujících závažné negativní vedlejší účinky.

LITERATURA

- [1] SOCIETY, A. C. *What Is Cancer?* [online]. Dostupné z URL: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>.
- [2] TACAR, O. et al. *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013, sv. 65, č. 2, s. 157-170. ISSN 0022-3573.
- [3] YAN SHEN, E. W. *p53-Dependent apoptosis pathways*. Advances in Cancer Research, 2004, sv. 82, s. 55-84.
- [4] ERKEKOL, F. O. et al. *Hypersensitivity reactions due to chemotherapy drugs: what are the choices?* Allergy, 2011, sv. 66, s. 382-382. ISSN 0105-4538.
- [5] CARVALHO, C. et al. *Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect*. Current Medicinal Chemistry, 2009, sv. 16, č. 25, s. 3267-3285. ISSN 0929-8673.
- [6] YANG, Z. X. et al. *Nanomedicine: de novo design of nanodrugs*. Nanoscale, 2014, sv. 6, č. 2, s. 663-677. ISSN 2040-3364.
- [7] NG, K. K. et al. *Lipoprotein-Inspired Nanoparticles for Cancer Theranostics*. Accounts of Chemical Research, 2011, sv. 44, č. 10, s. 1105-1113. ISSN 0001-4842.
- [8] LONGMIRE, M. et al. *Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats*. Nanomedicine, 2008, sv. 3, č. 5, s. 703-717. ISSN 1743-5889.
- [9] ROSE, P. G. *Pegylated liposomal doxorubicin: Optimizing the dosing schedule in ovarian cancer*. Oncologist, 2005, sv. 10, č. 3, s. 205-214. ISSN 1083-7159.
- [10] KOBAYASHI, H. a BRECHBIEL, M. W. M. W. *Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, sv. 57, č. 15, s. 2271-2286. ISSN 0169-409X.
- [11] MAEDA, H. *Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects*. Bioconjugate Chemistry, 2010, sv. 21, č. 5, s. 797-802. ISSN 1043-1802.
- [12] KANO, M. R. et al. *Improvement of cancer-targeting therapy, using nano-carriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, sv. 104, č. 9, s. 3460-3465. ISSN 0027-8424.

- [13] KONERDING, M. A. et al. *Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: A review*. Scanning Microscopy, 1995, sv. 9, č. 4, s. 1233-1244. ISSN 0891-7035.
- [14] JAIN, R. K. *Determinants of Tumor Blood-Flow - a Review*. Cancer Research, 1988, sv. 48, č. 10, s. 2641-2658. ISSN 0008-5472.
- [15] MORIKAWA, S. et al. *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. American Journal of Pathology, 2002, sv. 160, č. 3, s. 985-1000. ISSN 0002-9440.
- [16] STOHRER, M. et al. *Oncotic pressure in solid tumors is elevated*. Cancer Research, 2000, sv. 60, č. 15, s. 4251-4255. ISSN 0008-5472.
- [17] TREDAN, O. et al. *Drug resistance and the solid tumor microenvironment*. Journal of the National Cancer Institute, 2007, sv. 99, č. 19, s. 1441-1454. ISSN 0027-8874.
- [18] AU, J. L. S. et al. *Clinical aspects of drug delivery to tumors*. Journal of Controlled Release, 2002, sv. 78, č. 1-3, s. 81-95. ISSN 0168-3659.
- [19] KOBAYASHI, H. et al. *Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target?* Theranostics, 2014, sv. 4, č. 1, s. 81-89. ISSN 1838-7640.
- [20] JORDAN, B. F. et al. *Dynamic contrast-enhanced and diffusion MRI show rapid and dramatic changes in tumor microenvironment in response to inhibition of HIF-1 alpha using PX-478*. Neoplasia, 2005, sv. 7, č. 5, s. 475-485. ISSN 1522-8002.
- [21] KOBAYASHI, H. et al. *Application of a macromolecular contrast agent for detection of alterations of tumor vessel permeability induced by radiation*. Clinical Cancer Research, 2004, sv. 10, č. 22, s. 7712-7720. ISSN 1078-0432.
- [22] BOTTINI, M. et al. *Targeted Nanodrugs for Cancer Therapy: Prospects and Challenges*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014, sv. 14, č. 1, s. 98-114. ISSN 1533-4880.
- [23] JANIB, S. M. et al. *Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, sv. 62, č. 11, s. 1052-1063. ISSN 0169-409X.
- [24] GUITART, M. C. C. *Rapid Drug Desensitization for Hypersensitivity Reactions to Chemotherapy and Monoclonal Antibodies in the 21st Century*. Journal of

- Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2014, sv. 24, č. 2, s. 72-79. ISSN 1018-9068.
- [25] XIE, J. et al. *Nanoparticle-based theranostic agents*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, sv. 62, č. 11, s. 1064-1079. ISSN 0169-409X.
 - [26] PEER, D. et al. *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nature Nanotechnology, 2007, sv. 2, č. 12, s. 751-760. ISSN 1748-3387.
 - [27] JIACHEN ZANG, H. C. *Ferritin cage for encapsulation and delivery of bioactive nutrients: From structure, property to applications*. Food Science and Nutrition, 2016, sv. 46, s. 5-12.
 - [28] ILARI, A. et al. *The dodecameric ferritin from Listeria innocua contains a novel intersubunit iron-binding site*. Nature Structural Biology, 2000, sv. 7, č. 1, s. 38-43. ISSN 1072-8368.
 - [29] LI, C. R. et al. *Protein Association and Dissociation Regulated by Ferric Ion a Novel Pathway for Oxidative Deposition of Iron in Pea Seed Ferritin*. Journal of Biological Chemistry, 2009, sv. 284, č. 25, s. 16743-16751. ISSN 0021-9258.
 - [30] UCHIDA, M. et al. *The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2010, sv. 1800, č. 8, s. 834-845. ISSN 0304-4165.
 - [31] IWAHORI, K. et al. *Fabrication of ZnSe nanoparticles in the apoferritin cavity by designing a slow chemical reaction system*. Inorganic Chemistry, 2005, sv. 44, č. 18, s. 6393-6400. ISSN 0020-1669.
 - [32] CORSI, B. et al. *Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism*. Journal of Biological Chemistry, 2002, sv. 277, č. 25, s. 22430-22437. ISSN 0021-9258.
 - [33] SUZUMUTO, Y.; OKUDA, M.; YAMASHITA, I. *Fabrication of zinc oxide semiconductor nanoparticles in the apoferritin cavity*. Cryst. Growth Des. 2012, 12, 4130-4134.
 - [34] BLAZKOVA, I.; NGUYEN, H.V.; DOSTALOVA, S.; KOPEL, P.; STANISLAVLJEVIC, M.; VACULOVICOVA, M.; STIBOROVA, M.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R.; ADAM, V. *Apo ferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery*. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14, 13391-13402. ISSN 1422-0067.

- [35] VIGELSO, A.; DYBBOE, R.; HANSEN, Ch. N.; DELA, F.; HELGE, J. W.; GRAU, A. G. *GAPDH and β -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle*. Journal of Applied Physiology Published, 2015. ISSN 1522-1601.
- [36] SVENSON, S. *Theranostics: Are We There Yet?* Mol. Pharmaceutics 2013, 10, 848–856.
- [37] NATIVO, P.; PRIOR, I. A.; BRUST, M. *Uptake and Intracellular Fate of Surface-modified Gold Nanoparticles*. ACS Nano 2008, 2, 1639–1644.
- [38] KILIC, M. A.; OZLU, E.; CALIS, S. *A Novel Protein-based Anticancer Drug Encapsulating Nanosphere: Apoferritin-doxorubicin Complex*. J. Biomed. Nanotechnol. 2012, 8, 508–514.
- [39] MATTSON, M. P. *Hormesis defined*. Ageing Research Reviews, 2008, sv. 7, s. 1–7.

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

BSA	hovězí sérový albumin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPR	efekt zvýšené permeability a retence
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
RES	retikuloendoteliální systém
SDS	dodecylsírán sodný
TfR1	transferinový receptor
TK	tlak krve
kDa	kilodalton